

Aus dem Institut für
Kardiovaskuläre Physiologie und Pathophysiologie
(im Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin)
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. U. Pohl

**Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung von
Endothelzellen und Perizyten aus Arteriolen und Venulen
des Rinderherzens**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Stefan Förch
aus Würzburg
2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Stephan Nees

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Andreas Schober

Priv. Doz. Dr. Alexander Becker

Prof. Dr. Peter Überfuhr

Mitbetreuung durch den
Promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 14.03.2013

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Materialien und Methoden	6
2.1. Verbrauchsmaterialien	6
2.2. Geräte	6
2.3. Spezialanfertigungen	7
2.4. Gase und Gasgemische	7
2.5. Feinchemikalien	7
2.6. Lösungen	8
2.7. Reagentien für die Histologie	9
2.8. Zellkulturmedien	10
2.9. Methodik	10
2.9.1. Enzymatische Dissoziation von Herzen verschiedener Spezies	10
2.9.1.1. Enzymatische Dissoziation von Ratten- und Meerschweinchenherzen	10
2.9.1.2. Enzymatische Dissoziation von Rinderherzen	12
2.9.2. Gewinnung stark angereicherter Zellsuspensionen als Ausgangspräparate für venuläre und arterioläre Endothelzell- bzw. Perizytenkulturen	15
2.9.3. Gewinnung reiner Zellkulturen endothelialen oder perizytären Ursprungs durch verschiedene zellkultivatorische Methoden	16
2.9.3.1. Isolierung venulärer Endothelzellen	16
2.9.3.2. Isolierung arteriolärer Endothelzellen	18
2.9.3.3. Isolierung von Perizyten	19
2.9.4. Histologische Methoden	19
2.9.4.1. Enzymhistochemische Untersuchungen	19
2.9.4.2. Fluoreszenzhistologie	20
2.9.5. Massenkultur von Perizyten	21
2.9.5.1. Massenkultur von Perizyten auf Mikrocarriern	21
2.9.5.2. Massenkultur von Perizyten in speziellen Wachstumssäulen	23
2.9.6. Wachstumsbeobachtungen an lebenden Zellkulturen unter dem Mikroskop	25

3. Ergebnisse	26
3.1. Schaffung verbesserter apparativer und methodischer Voraussetzungen zur vollständigen und routinemäßigen proteolytischen Desintegration von Herzen verschiedener Spezies	26
3.2. Suche nach einer einfachen Methode zur Gewinnung stark angereicherter Zellsuspensionen als Ausgangspräparate für Endothelzellen und Perizyten aus Venulen und Arteriolen des Myokardgewebes	31
3.3. Erprobung verschiedener methodischer Verfahren zur Gewinnung reiner Zellkulturen endothelialen und perizytären Ursprungs	33
3.3.1. Reinigung von Kulturen durch Ausschabetechnik	33
3.3.2. Reinigung von Kulturen durch selektive Verminderung der Adhäsivität von Perizyten	37
3.3.3. Selektive Proliferation arteriolärer Endothelzellen durch Kombination zweier Wachstumsmedien und Anwendung eines speziell erprobten Zeitprotokolles	39
3.4. Histologische Charakterisierung der erhaltenen Zellkulturen	42
3.4.1. Untersuchung von Zellen venulären Ursprungs	42
3.4.2. Untersuchung von Zellen arteriolären Ursprungs	46
3.5. Gewinnung reiner Perizytenkulturen und Erprobung bzw. Weiterentwicklung von Verfahren zur Massenkultur von Perizyten mikrovaskulären Ursprungs aus dem bovinen Koronarsystem	48
3.5.1. Isolierung reiner Perizytenkulturen in größerem Ausmaß	48
3.5.2. Massenkultur von Perizyten	51
4. Diskussion	56
4.1. Proteolytische Desintegration von Myokard und Gewinnung angereicherter Zellsuspensionen	56
4.2. Isolierung von mikrovaskulären Endothelzellen venulären Ursprungs	58
4.3. Isolierung von mikrovaskulären Endothelzellen arteriolären Ursprungs	60
4.4. Isolierung von Perizyten	61
4.5. Identifizierung der isolierten Endothelzellen und Perizyten	63
4.6. Massenkultur auf Mikrocarriern	64
5. Zusammenfassung	65

III

Literaturverzeichnis	67
Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	72
Danksagung	73

1. Einleitung

Endothelzellen kleiden bekanntlich das gesamte Kreislaufsystem einschließlich der Herzhöhlen aus^{1,2}. Der von ihnen gebildete, stets einschichtige³ und daher sehr dünne Gewebefilm (0,1-3 μm je nach vaskulärem Ursprung des betrachteten Endothels¹) bildet dennoch die entscheidende Barriere für den Stoff- und Zellaustausch zwischen dem Blut und den angrenzenden Binde- und Parenchymgeweben³. Gleichzeitig stellt das Endothel in seiner gesamten vaskulären Ausbreitung den eigentlichen Blutbehälter dar.

Aufgrund dieser exponierten Stellung und ubiquitären Ausbreitung im Körper fallen dem vaskulären Endothel vitale Funktionen zu, ohne die eine Aufrechterhaltung der Homöostase undenkbar wäre. In diesem Zusammenhang sind an erster Stelle die zentralen Funktionen des Endothels im Rahmen der Hämostase zu nennen^{4,5}. Nur aufgrund kontinuierlich erfüllter antiaggregatorischer, antikoagulatorischer und profibrinolytischer Funktionen des Endothels bleibt das Blut im Kreislaufsystem dauerhaft im flüssigen Zustand und kann so selbst durch die engsten Kapillaren fließen, um seinen komplexen Aufgaben im Rahmen des Stoffaustausches und der Körperabwehr gerecht zu werden. Umgekehrt kann bei einer Verletzung oder Zerstörung des Endothels rasch ein thrombotischer Wundverschluss induziert werden⁶, weil das aus der Wunde strömende Blut vom direkten Kontakt mit dem Endothel abgekoppelt ist, die Gesamtheit der antithrombotischen Wirkfaktoren dieses Gewebes kurzlebig ist und daher rasch aus dem Blut eliminiert wird. In letzter Zeit ist nicht zuletzt auch durch Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Prof. Nees, in der die vorliegende experimentelle Doktorarbeit durchgeführt wurde, deutlich geworden, dass im Zusammenhang mit hämostasiologischen, also das Blut rasch in den festen Aggregatzustand eines Thrombus transferierenden, Funktionen vor allem auch dem Zelltyp des Perizyten herausragende Funktionen zuzumessen sind⁷⁻⁹. Der bis heute immer noch weit verbreiteten Lehrmeinung nach handelt es sich bei diesen unentbehrlichen Begleitzellen des Endothels um typische Baukomponenten von Mikrogefäßen¹⁰. Doch multifunktionelle Perizyten sind auch konstitutive Bestandteile des Subendothels der Intima großer Arterien und Venen¹¹ und sie sind sowohl in histologischer wie funktioneller Hinsicht ganz eng mit dem luminalen Endothel der großen Arterien und Venen verschaltet^{12,13}. Aufgrund ihres charakteristischen Membranproteins „tissue factor“ können diese Zellen eindeutig identifiziert werden.

Vor allem handelt es sich bei diesem „Gewebefaktor“ um den zentralen Katalysator nahezu aller medizinisch relevanten Gerinnungsprozesse¹⁴. Kommen Perizyten nach einer mechanischen Läsion oder unphysiologischen Öffnung der normalerweise dichten endothelialen Zellverbindungen in direkten Kontakt mit Blut, wird an ihrer Oberfläche sofort Thrombin gebildet, das dann eine nahezu augenblickliche Plättchenaggregation, einen schnell wachsenden Fibrinthrombus und Entzündungsprozesse induziert.

Neben diesen hier nur summarisch angedeuteten Funktionen im Rahmen der Hämostase entfaltet das vaskuläre Endothel auch eine ganze Reihe weiterer physiologischer Funktionen, die stark vom Gefäßtyp geprägt sind¹⁵. So handelt es sich neuerer Erkenntnis nach bei der luminalen Auskleidung aller Arterien und Venen um ein besonders dichtes Endothel¹⁶, dessen Barriereigenschaften eine wichtige Voraussetzung für den Aufbau und den Unterhalt spezialisierter Gefäßwandkompartimente (Intima, Media und Adventitia) darstellen. Insbesondere müssen im Plasma vorhandene Gerinnungs-, Komplement- und Wachstumsfaktoren, Lipoproteine, sowie zahlreiche vasoaktive Substanzen durch das lumenale Endothel vom direkten Kontakt mit tieferen Gefäßwandschichten abgeschirmt werden, um proliferative oder auch egenerative Prozesse zu unterdrücken^{2,15-17}.

Das spezielle Endothel der Arteriolen muss über die genannten hochmolekularen Proteine und Peptide hinaus auch für viele kleinmolekulare, vasoaktive Verbindungen sehr dicht sein, weil nur so ihre herausragende physiologische Stellung als Steuergefäße im Rahmen der Durchblutungsregulation der Körperorgane gewährleistet ist. Bekanntlich findet eine zweckmäßige und fein regulierbare Widerstandsregulation durch Integration nervaler, metabolischer, hormoneller, mechanischer und endothelialer Steuerimpulse statt, die durch kleinmolekulare, meist hydrophile Freisetzungserzeugnisse bewirkt werden. Dies setzt die Schaffung spezifischer Stoffwechsellmilieus in und um die Arteriolen voraus, die nur solange aufrecht erhalten werden können, wie das arterioläre Endothel seine extreme Dichtigkeit behält. Zusätzlich stellt die extrazelluläre Matrix der subendothelialen Perizyten, die diese zwischen dem luminalen Endothel und den glatten Muskelzellen der Arterien liegenden Zellen wie ein Kokon umgibt, einen großen Diffusionswiderstand für hydrophile Stoffwechselmediatoren dar¹⁸. Interessante und hochspezifische Anforderungen an die Endothelschranke zwischen dem Blut und den jeweiligen Organgeweben ergeben sich auch in den kapillären

Strombahnen, in denen das Endothelgewebe in vielen histologischen Spielarten vorliegen kann und so insgesamt seinen größten Formenreichtum entfaltet. Dabei besitzt auch bei kapillären Blutgefäßen die Aufrechterhaltung einer besonderen Dichtigkeit bzw. selektiven Schrankenfunktion zwischen dem Intra- und Extravasalraum einen besonderen, für die Funktionsfähigkeit des jeweils zugeordneten Organs zentralen Stellenwert. So liegt vor allem in den Kapillaren des Gehirns ein extrem dichtes, durch umlaufende tight junctions charakterisiertes Endothel vor¹⁹, das den notwendigen Stoffaustausch im allgemeinen nur transzellulär (und lediglich im Krankheitsfall auch parazellulär) zulässt. Um diesen Austausch von Nährstoffen, Metaboliten und Hormonen über die Kapillarwand zu gewährleisten, hat das - auch noch durch eng assoziierte Perizyten und Astrozyten sowie eine doppelte Basalmembran geformte - Endothelrohr der cerebralen Kapillaren zahlreiche hochspezifische membranäre und pinozytotische Transportsysteme entwickelt. Man male sich nur aus, welches Nachrichtenchaos besonders nach proteinreicher Kost wie dem Verzehr eines Steaks entstünde, wenn die vom Darm ins Blut einflutenden Aminosäuren ungesteuerten, direkten Kontakt zum Nervengewebe bekämen und dann diffuse Transmitterfunktionen induzierten (die meisten Transmitter sind Aminosäuren oder direkte Derivate davon)!

Andere kapilläre Endothelgewebe, wie z. B. die der fenestrierten Kapillaren in allen endokrinen Organen, entfalten hochspezifische Hormontransportfunktionen. Die lückenhaften Endothelgewebe von Leber und Milz gestatten den unbehinderten transkapillären Austausch selbst von Makromolekülen wie z. B. von Plasmaproteinen, deren Anabolismus wie Katabolismus zentral von den Leberzellen bewerkstelligt wird²⁰.

Eine besonders hochspezialisierte und komplexe Aufgabe kommt dem Endothel aller postkapillären Venulen - also dem der kleinsten Venen unseres Körpers - zu, in denen die Rekrutierung fast aller humoralen und zellulären Komponenten der immunologischen Systeme des Körpers erfolgt. Dies wird durch ein besonders kontraktiles und durch viele verschiedene Entzündungsmediatoren aktivierbares Endothel ermöglicht^{1,15,21}. Die Erforschung der verantwortlichen Regulationsprozesse und die Entfaltung spezieller endothelialer Adhäsionsproteine ist nach wie vor Gegenstand weltweiter Forschung. Immer klarer wird hierbei, dass die Rekrutierung der verschiedenen Leukozyten in den verschiedenen Phasen eines Entzündungsprozesses in das umgebende Gewebe eines Entzündungsherdes

zunächst durch selektive Adhäsionsproteine erfolgt, die speziell am postkapillären Endothel exprimiert werden. Sie finden ihre Bindungspartner auf der Oberfläche der entsprechend voraktivierten, zunächst noch im Blut befindlichen Abwehrzellen¹⁶. Schließlich kommt es zur Öffnung der Interzellularspalten und zur Diapedese der adhären gewordenen Leukozyten, wobei ebenfalls spezielle Oberflächenmoleküle eine große Rolle spielen.

Es versteht sich von selbst, dass es schon angesichts der hier nur kurz gestreiften vaskulären Funktionsvielfalt und Spezialisierung wünschenswert wäre, spezielle Endothelgewebe und Perizyten unter Erhalt ihrer typischen Eigenschaften in vitro zu züchten. Nur so können viele ihrer Eigenschaften und Reaktionen unter definierten Umgebungsbedingungen studiert werden. Seit Entwicklung der ersten Ansätze zur technisch sehr einfachen Isolierung und Kultivierung von Endothelzellen aus der menschlichen Nabelschnur im Jahre 1973 durch E. Jaffe²² hat sich jedenfalls die Erforschung dieses Gewebetyps enorm beschleunigt: im Jahr 1973 (Jahr von Jaffes Publikation) lassen sich 46 Forschungsarbeiten zum Stichwort „endothelial cell“ über das Pubmed-Literatursuchsystem (Sucheinstellung: „all fields“) dokumentieren, 2009 waren es dagegen 10.076 entsprechende Arbeiten, und die entsprechende Publikationsrate hat auch heute noch weiter ansteigenden Charakter. Demgegenüber fallen im selben Jahr 2009 die 243 wissenschaftlichen Arbeiten zum Stichwort „pericyte“ kaum ins Gewicht. Der entscheidende Grund dafür dürfte sein, dass dieser multifunktionelle und im Gefäßsystem ubiquitär vorhandene Zelltyp bis heute kaum überzeugend in homogenen Kulturen etabliert und über längere Zeit unter Erhalt seiner typischen Eigenschaften gezüchtet worden ist. Diese Tatsachen bildeten den Hintergrund für die Entwicklung zahlreicher neuer methodischer Ansätze und Technologien, mit denen sich die Arbeitsgruppe um Prof. Nees seit vielen Jahren befasst. Vor dem Hintergrund der gerade kurz umrissenen, auch medizinisch sehr interessanten Funktionen und meinem ausgeprägten Interesse an präparativen und zellkultivatorischen Arbeitsmethoden fand ich es zunehmend interessant, meine Doktorarbeit in diesen Themenkreis einzuordnen.

Im Einzelnen ergaben sich folgende Zielsetzungen:

1. Schaffung verbesserter apparativer und methodischer Voraussetzungen zur vollständigen und routinemäßigen proteolytischen Desintegration von Herzen verschiedener Spezies. Dabei sollte auf schon bestehende Erfahrungen zurückgegriffen werden und deren Reproduzierbarkeit verbessert werden.
2. Suche nach einer einfachen Methode zur Gewinnung stark angereicherter Zellsuspensionen als Ausgangspräparate zur Isolierung von Endothelzellen und Perizyten aus Venulen und Arteriolen des Myokardgewebes.
3. Erprobung verschiedener zellkultivatorischer Ansätze zur Gewinnung reiner Zellkulturen endothelialen oder perizytären Ursprungs.
4. Histologische Charakterisierung der erhaltenen Zellkulturen.
5. Erprobung und Weiterentwicklung von Verfahren zur Massenkultur von Perizyten mikrovaskulären Ursprungs aus dem bovinen Koronarsystem.

2. Materialien und Methoden

2.1. Verbrauchsmaterialien:

- Drei-Wege-Hähne, Sterile Kanülen und Einmalspritzen: Braun, Melsungen
- Viton-Schläuche: Labokron, Sinsheim
- Sterile Einmalpipetten: 2, 10 und 25 ml, Falcon Becton Dickinson, Franklin Lake, NJ, USA; 5 ml, Corning, New York
- Zellkulturschalen, Durchmesser: 35 mm, Fläche 9,6 cm²; Durchmesser: 60 mm, Fläche 19,6 cm², Tissue Culture Flasks, 50 ml, Fläche: 25 cm²: Falcon Becton Dickinson, Franklin Lake, NJ, USA; Durchmesser: 145 mm, Fläche: 165 cm², Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
- Mikrocarrier, Pharmacia, Uppsala
- Sterile Zentrifugenröhrchen 15 ml und 50 ml, Falcon Becton Dickinson, Franklin Lake, NJ, USA
- Spritzenaufsatz-Sterilfilter, 0,2 µm Porengröße, Schleicher und Schuell MicroScience GmbH, Dassel
- Midisart 2000 Venting Filter, 0,2 µm Porengröße, Sartorius AG, Göttingen
- Membranfilter für Flaschenaufsatzfilter, 0,2 µm Porengröße, Sartorius AG, Göttingen
- Pipettenspitzen 10, 100, 1000 und 2500 µl für Eppendorfpipetten, Eppendorf, Hamburg
- Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml und 2 ml, Eppendorf, Hamburg

2.2. Geräte:

- Autoklaven: Wolf Sanoclav, Geislingen
Steam autoclave 3850, Tuttnauer Co. Ltd., New York, USA
- Zentrifugen: Programmierbare Kühlzentrifuge 4K10, Sigma, Osterode
Eppendorfszentrifuge 5412, Eppendorf, Hamburg
- Sterilbank: Herasafe, Heraeus, Hanau
- Brutschrank: Functionline, Heraeus, Hanau
- Spezialbrutschrank für die Massenkultur auf Microbeads in Kolben bzw. in Säulen: Edmund Bühler, Tübingen

- pH-Meter: Typ 766, Calimatic, Knick, Berlin
- Waagen: laboratory, Sartorius AG, Göttingen
GR-202, neoLab, Heidelberg
- Mikroskope: Axiovert 25, Axiovert 200 m mit Digitalkamera und Software Axio Vision 4.4, Axioscop (mit Fluoreszenzfiltersätzen 487902, 487915, 487909, Lampe HBO): Zeiss, Göttingen
- Pumpen: Peristaltic Pump 3600, Colora Messtechnik GmbH, Lorch
Peristaltic Pump 10200 Perplex, LKB, Bromma, Schweden
Peristaltic Pump, OLE DICH, Hvidovre, Denmark
- Flaschenaufsatzfilter: Bottle Top Filter Unit, Nalgene, Rochester, USA

2.3. Spezialanfertigungen:

- Glastrichter und Durchlauferhitzer, Glasbläserei Martinsried
- Plexiglassäulen mit Anschlüssen, Feinwerkstatt der LMU

2.4 Gase und Gasgemische:

- CO₂
 - Carbogen: 95% O₂, 5% CO₂
 - 72% N₂, 10% CO₂, 18% O₂
- alle Linde, München

2.5. Feinchemikalien:

Im Folgenden nicht spezifizierte Chemikalien wurden durchweg in p. a. – Qualität von der Firma Merck, Darmstadt bezogen.

- Ethanol 99% vergällt mit 1% Methylethylketon, Methanol, HEPES · Na, Glutaraldehyd, Formaldehyd: Carl Roth, Karlsruhe
- Albumin (bovine), Percoll, Echtblausalz, Gly-Pro-4-Methoxy-β-Naphtylamide, Fast blue BB, Naphtol-ASMX-Phosphat: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
- Trypsin from bovine pancreas (3,60 U/mg), HEPPSO: Serva, Heidelberg

- Collagenase D, Dispase I, Liberase Blendzyme I und IV: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- Collagenase Type 2: Worthington, Lakewood, USA
- Wachstumsfaktoren: bFGF und EGF: Gibco/Invitrogen, Karlsruhe

2.6. Lösungen:

Wasser zum Ansetzen der folgenden Lösungen wurde aus einer Reinstwasseranlage der Firma Millipore Q mit einer Liqui Pure 1 Cartridge (USF) gewonnen.

- *Proteaselösung I* (Angaben in Massenprozent: w/v):
Liberase Blendzyme IV: 0,009%, Dispase I: 0,012%, Albumin 0,2%
Gelöst in *KHM*, durch einen 0,2 µm Filter sterilfiltriert.
- *Proteaselösung II* (Angaben in Massenprozent: w/v):
Liberase Blendzyme IV: 0,009%, Dispase II: 0,012%, Trypsin: 0,006%, Albumin 0,2%
Gelöst in *KHM*, durch einen 0,2 µm Filter sterilfiltriert.
- *Dispase II – Lösung* (Angaben in Massenprozent: w/v):
Dispase II: 0,01%
Gelöst in *KHM*, durch einen 0,2 µm Filter sterilfiltriert.
- *Trypsin/EDTA – Lösung* (Angaben in Massenprozent: w/v):
Trypsin: 0,05%, EDTA: 0,02%
Gelöst in PBS, durch einen 0,2 µm Filter sterilfiltriert und bei – 18° C gelagert.
- *PBS: Phosphat – gepufferte Saline* (Angaben in mM):
NaCl: 142, KH₂PO₄: 5
Der pH wurde mit NaOH auf 7,40 eingestellt und die Lösung bei 121°C für 45 min autoklaviert.
- *KHM: Krebs – Henseleit – Medium* (Angaben in mM):
NaCl: 127, KCl: 4,6, MgSO₄ · 7 H₂O: 1,1, KH₂PO₄: 1,2, Glucose: 7,6, NaHCO₃: 24,9, Pyruvat: 2, Kreatin: 10, Taurin: 20, Ribose: 5, L – Asparaginsäure: 2, L – Glutamin: 2, L – Arginin: 1, Harnsäure: 0,5
Die Lösung wurde durch einen 0,2 µm Filter sterilfiltriert.

- *ES: Earle – Salt* (Angaben in mM):
NaCl: 142, KCl: 5,4, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$: 0,8, NaH_2PO_4 : 1
Der pH wurde mit NaOH auf 7,40 eingestellt und die Lösung bei 121°C für 45 min autoklaviert.
- *HES: Hepes – Earle – Salt* (Angaben in mM):
NaCl: 142, KCl: 5,4, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$: 0,8, NaH_2PO_4 : 1, D – Glucose: 5,5, HEPES: 25
Die Lösung wurde auf einen pH von 7,40 eingestellt und durch einen 0,2 µm Filter sterilfiltriert.
- *Modifiziertes HES:*
Der *HES* – Lösung wird über einen 0,2 µm Filter 0,1% (w/v) Albumin und Heparin 2500 IE/l zugegeben.
- *Kardioplegische Lösung nach Bretschneider* (Angaben in mM):
NaCl: 15,0, KCl: 10,0, $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$: 4,0, $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,015, α - Ketoglutarinsäure: 1,0, L – Histidin: 198,0, L – Tryptophan 2,0, Mannitol 30,0
Die Lösung wurde auf einen pH von 7,40 eingestellt und durch einen 0,2 µm Filter sterilfiltriert.

2.7. Reagentien für die Histologie

- Anti-human vonWillebrand factor sheep, FITC-conjugate; anti-human CD31 (platelet endothelial cell adhesion molecule: PECAM) mouse mAb: Serotec, Kidlington, GB
- Anti-tissue factor mouse mAb (Cat. No. 4509), rabbit pAb (Cat. No. 4502): American Diagnostica, Greenwich, USA
- Anti- α -smooth muscle actin mAb clone 1A4, mouse ascites IgG (Cat. No. A2547); anti- α -smooth muscle actin clone 1A4, FITC-conjugat (Cat. No. F3777); anti-vWF rabbit IgG (Cat. No. F3520); Monoclonal rat anti-mouse kappa light chains Clone EM.34.1 (Cat. No. K2132); anti-mouse IgG (Cat. No. A3562); anti-rabbit AP-conjugat (Cat. No. A3812); 2-(4-Amidinophenyl)-6-Indolcarbamidin Dihydrochlorid (DAPI): Sigma, Deisenhofen, Germany
- Anti-mouse IgG Alexa Fluor 350, 488 und 546, anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 und 546, anti-goat IgG 546, anti-rat IgG 546; SYTOX® Green; Dil-acLDL; SlowFade® Light Antifade Kit: Molecular Probes, Eugene, USA

2.8. Zellkulturmedien:

Jeweils durch einen 0,2 µm Filter sterilfiltriert.

- *DMEM:*
Dulbecco's Modified Eagle's Medium mit 10% *FCS* und 200 U/ml Penicillin und 0,2 mg/ml Streptomycin
- *Promocell-Medium:*
Endothelial Cell Growth Medium der Firma Promocell (Cat.No: C-22010) mit 2% *FCS*
- *Mischmedium:*
DMEM und *Promocell* im Mischungsverhältnis 1:1. Damit ergibt sich ein Anteil von 6% *FCS*
- *Gibco-Medium:*
Human Endothelial-SFM Basal Growth Medium der Firma Gibco (Cat.No.: 11111-044) mit 10% *FCS*, 200 U/ml Penicillin und 0,2 mg/ml Streptomycin, 1 µg/ml Fibronectin, 10 ng/ml EGF und 20 ng/ml bFGF

Die im folgenden Text kursiv geschriebenen Bezeichnungen beziehen sich jeweils auf die oben aufgeführten und näher beschriebenen Lösungen bzw. Medien.

2.9. Methodik

2.9.1. Enzymatische Dissoziation von Herzen verschiedener Spezies

Der Zielsetzung dieser Arbeit entsprechend wurden bereits vorhandene Techniken zur enzymatischen Dissoziation überprüft, weiterentwickelt und vollkommen neue Ansätze integriert. Im Folgenden werden die Methoden beschrieben, die sich in langen Versuchreihen am besten bewährt haben.

2.9.1.1. Enzymatische Dissoziation von Ratten- und Meerschweinchenherzen

In der Arbeitsgruppe um Prof. Nees wurden enzymatische Dissoziationen von Ratten- und Meerschweinchenherzen schon seit längerem mit einer auf die Langendorff-Technik²³ zurückgehenden Methode durchgeführt. Im Rahmen der

vorliegenden Arbeit wurde diese verfeinert und zur besseren Reproduzierbarkeit wurden wichtige Modifikationen durchgeführt. Mit dem in **Abbildung 5** (Ergebnisteil Seite 27) detailliert dargelegten Versuchsaufbau konnten reproduzierbar optimale Ergebnisse erzielt werden.

Die Apparatur bestand im Wesentlichen aus einem Durchlauferhitzer, an dessen Abgang das Kleintierherz über die kanülierte Aorta aufgehängt wurde, einem Vorratsgefäß für die Proteaselösung und zwei Gefäßen für *KHM*, eines davon mit einem Zusatz von 2,5 mM Ca^{++} , das andere mit 10 μM Papaverin. Die Dreiwegehähne wurden steril bezogen, die restliche Apparatur durch Autoklavieren für 15 Minuten bei 121°C sterilisiert und nach der Abkühlung unter Einhaltung höchstmöglicher Sterilität verbunden.

Der Durchlauferhitzer und der Trichter für die Nachverdauung wurden mit auf 37°C temperierten aqua bidest. geflutet und kontinuierlich durchspült. Das Gefäß 1 wurde mit 500 ml *KHM* mit 2,5 mM Ca^{++} , das Gefäß 2 mit 500 ml *KHM* mit 10 μM Papaverin und das Gefäß 3 mit 50 ml *Proteaselösung II* gefüllt und leicht begast. Die Leitungen wurden in folgender Reihenfolge luftleer gespült: *Proteaselösung II*, *KHM* Ca^{++} -frei und *KHM* mit 2,5 mM Ca^{++} . Luftblasen wurden über den Blasenfänger abgelassen.

Ca. 300 g schwere Ratten bzw. 300 - 400 g schwere Meerschweinchen wurden in einem nahezu luftdicht abschließbaren Behälter mit Äther betäubt und nach Heparinisierung (7600 I. E. Nadroparin-Calcium) getötet. Auf einem speziellen Präparationstisch wurden die Tiere an Vorder- und Hinterläufen rücklings eingespannt, worauf mit einer Schere zunächst das Bauchfell eröffnet, nach beiden Seiten weggeklappt und mit Hilfe von Arterienklemmen fixiert wurde. Nach Eröffnen der Brusthöhle und Entfernen des Sternums mit Rippenansätzen konnte das Herz freigelegt und aus der Perikardhöhle gelöst werden. Unter Spülung mit eiskalter 0,9% NaCl-Lösung kam das Herz zum Stillstand. Nun wurde die Aorta aufgesucht, unterminiert und eröffnet. Eine Metallkanüle in passender Größe wurde auf eine Spritze mit sterilem *KHM* aufgesetzt, luftfrei gespült und in das Gefäß eingeführt. Mit Hilfe einer Ligatur wurde die Kanüle fixiert und gleichzeitig abgedichtet.

Das Herz wurde dann zusammen mit den Lungenresten entnommen und die eingebundene Kanüle auf das entsprechende Ende des Durchlauferwärmers aufgesetzt. Um Luftembolien zu vermeiden, musste dies bei bereits laufender Perfusion geschehen. Der Fluss erfolgte nun retrograd in der Aorta und, intakte Klappen vorausgesetzt, ausschließlich antegrad in den Koronargefäßen. Die

Pulmonalgefäße konnten dann abgebunden und die Lungenreste sauber abpräpariert werden. Durch Spülen mit dem Ca^{++} -haltigen *KHM* wurde das Herz wieder zum Schlagen gebracht und auf diese Weise blutleer gepumpt. Mit Hilfe des Ca^{++} -freien Mediums wurde es nach einigen Minuten erneut zum Stillstand gebracht. Jetzt wurde zunächst auf freie Perfusion mit *Proteaselösung II* unter einem Druck von ca. 120 mbar umgestellt und das Herz gleichzeitig in einem Falcon Tube versenkt, das randvoll mit isotonischer Percoll-Lösung der Dichte $1,047 \text{ g/cm}^3$ gefüllt war. Beim Aufsetzen des Stopfens wurde darauf geachtet, dass keine Luftblase in der Percoll-Lösung zurückblieb und die überschüssige Percoll-Lösung über die geöffnete Abtropfleitung des Stopfens abfließen konnte. Sobald der Stopfen fest saß, wurde die Proteaseperfusion flusskonstant (unter Zuhilfenahme einer peristaltischen Pumpe) mit 1 ml/min fortgesetzt. Die aus dem Herzen austretende Proteaselösung stieg dabei in der dichteren Percoll-Lösung sofort an die Oberfläche auf und floss ab, ohne in nennenswerten Kontakt mit dem Epikard zu kommen.

Nach Abschluss der Enzymperfusion wurde das Herz steril aus dem Falcon Tube entnommen, mit Hilfe einer Rasierklinge auf einer autoklavierten Teflonplatte zerkleinert und in einen speziellen Glastrichter überführt, der zur Nachverdauung mit 25 ml frischer, 37°C warmer *Proteaselösung II* gefüllt war. Der Trichter wurde von seinem spitz ausgezogenen Auslauf her langsam von sterilen Carbogengasblasen durchperlt (ca. 1 Blase/Sekunde), die im Bereich des Auslassrohres auftretenden Scherkräfte zerlegten das Gewebe sehr schonend weiter. Wenn nach mikroskopischer Kontrolle der gewünschte Dissoziationsgrad erreicht war, konnte das Gewebe durch ein Netz mit $50 \mu\text{m}$ Maschenweite gesiebt und mittels der in 2.9.2. (Seite 15) beschriebenen Dichtezentrifugation weiter aufgearbeitet werden.

2.9.1.2. Enzymatische Dissoziation von Rinderherzen

Während des gesamten Versuchsablaufes musste auf höchstmögliche Sterilität und Arbeiten unter aseptischen Bedingungen geachtet werden.

Im Schlachthof wurde das Herz eines frisch geschlachteten Rindes mit großem Aortenstumpf exzidiert. Auf Unversehrtheit des Myokards war dabei unbedingt zu achten. Die Aorta wurde abgesetzt und die Ostien der rechten und der linken Koronararterie mit je 250 ml eiskalter *modifizierter HES*-Lösung gespült. In einem

passenden sterilen mit *HES* gefüllten Gefäß wurde das Herz unter Kühlung im Eiswasserbad ins Labor transportiert, wo die proteolytische Dissoziation erfolgte.

Ein Schema zum Aufbau der gesamten Versuchsanordnung wird in **Abbildung 7** (Seite 30, Ergebnisteil) wiedergegeben, dort werden viele apparative Einzelheiten zur enzymatischen Dissoziation von Myokardgewebe verdeutlicht. Außer den steril bezogenen Drei-Wege-Hähnen wurden alle Flüssigkeitsbehälter und Schläuche bei 121°C 15 min autoklaviert und nach dem Abkühlen unter Einhaltung höchstmöglicher Sterilität verbunden (siehe hierzu **Abb. 7**). Danach wurden der Durchlauferhitzer sowie der Sammeltrichter mit 37°C warmem aqua bidest. geflutet und kontinuierlich durchspült. Ins Wärmebad wurde ein Gefäß mit 1l *PBS* zum späteren Spülen und Erwärmen des Herzens gestellt. Nun wurde das Vorratsgefäß 1 mit ca. 1800 ml *KHM*, das Gefäß 2 mit 90 ml und das Gefäß 2' mit 60 ml *Proteaselösung I* gefüllt; alle drei wurden mit Carbogengas aus dem Reservoir begast. Um in der Enzymlösung eine Schaumbildung und die damit verbundene Zerstörung von Proteinen zu vermeiden, sollte dies allerdings sehr vorsichtig geschehen. Der Durchlauferhitzer sowie die fünf angeschlossenen Schläuche mit Teflonkanülen wurden mit *KHM* sorgfältig blasenfrei gespült, eventuell aufgetretene Luftblasen über den Blasenfänger abgelassen.

Bei der Herzpräparation wurde zunächst ein von der Größe her passender Haltering ausgewählt und anschließend die Herzspitze basisnah abgesetzt, so dass sie ein kleines Stück über den Ring hinausragte und nicht hindurchrutschen konnte. Drei bis vier große epikardiale Koronararterien wurden aufgesucht und ca. 4 cm lange Teflonkanülen entsprechender Größe möglichst weit ins Gefäß eingeführt. Eine Fixierung erfolgte mittels Einzelknopfnäht. Nun wurden nach Bedarf eröffnete Gefäße an der Absetzungsfläche ligiert bzw. koaguliert (siehe hierzu auch **Abb. 6**, Seite 28, Ergebnisteil). Anschließend musste die Perfusion genau überprüft werden. Hierzu empfahl es sich, die Schnittfläche mit sterilen Tupfern zu trocknen, um eventuell vorhandene Leckströme besser erkennen und genau lokalisieren zu können. Bei guter Präparation waren die Koronarvenen nun prall gefüllt.

Zur Befestigung über dem Sammeltrichter wurde die Herzspitze in den Haltering eingesetzt und an drei bis vier Stellen per Annäht fixiert. Dabei mussten sich die Spitzen der eingebrachten Teflonkanülen unterhalb des Halterings befinden, um die Perfusion nicht zu unterbinden. Zur Sicherheit empfahl sich ein zusätzliches

Aufhängen des gesamten Präparates, hierzu wurde das Septum mehrfach angenäht und die Fadenenden zu einer Schlinge verknotet.

Nach Beendigung der Präparation wurde das Herz fünf Minuten lang mit *KHM* gespült und im *PBS*-Wärmebad angewärmt, bevor es am Haltering über dem Sammeltrichter befestigt und mit Hilfe der eingenähten Schlinge zusätzlich gesichert werden konnte. Unter einer sterilen Abdeckung wurde mit Carbogengas eine CO₂-Atmosphäre hergestellt. Für 45 Minuten erfolgte eine Perfusion mit Enzymlösung aus Gefäß 2, dann für eine weitere dreiviertel Stunde aus Gefäß 2'. Die Lösungen wurden hierbei jeweils über eine peristaltische Pumpe kontinuierlich in das entsprechende Ausgangsgefäß zurückgepumpt, so dass eine Zirkumfusion entstand. Um diese kontinuierlich gewährleisten zu können, mussten Pumpleistung und Perfusionsdruck entsprechend eingestellt und laufend überprüft werden. Nach 90 minütiger Enzymzirkumfusion und anschließender zweiminütiger Spülung mit *KHM* konnten die angedauten Teile der Herzspitze in einer sterilen Wanne mit Schere, Pinzette und einem scharfen Löffel abpräpariert und bei Bedarf mit Hilfe einer autoklavierten Rasierklinge weiter zerkleinert werden.

Nach Zugabe von 50 ml frischer *Proteaselösung I* erfolgte nun eine Nachverdauung in einer speziellen Steigrohrapparatur (**Abb. 1** auf der folgenden Seite) bei Raumtemperatur, bis nach mikroskopischer Kontrolle der gewünschte Dissoziationsgrad erreicht war. Diese Apparatur funktionierte als eine Art "automatischer Pipettor", bei dem durch intermittierenden Gasdruck die Gewebsmasse im Steigrohr nach oben in eine Aufweitung gepumpt wurde und bei abfallendem Gasdruck wieder nach unten sank (siehe **Abb. 1**, Teilbild b). Die Gaszufuhr wurde über eine Zeitschaltuhr geregelt. Es bewährten sich Intervalle von 15 Sekunden Gaszufuhr und 15 - 45 Sekunden Unterbrechung. Insgesamt wurden bei jedem Ansatz 30 solcher Zyklen durchlaufen.

Die nach 30 Zyklen schließlich erhaltene Zell- und Bindegewebssuspension wurde ausgesiebt (Filtration über ein Nylonnetz mit 200 µm Maschengröße), bevor eine weitere Auftrennung durch Dichtezentrifugation erfolgen konnte (siehe 2.9.2., Seite 15).

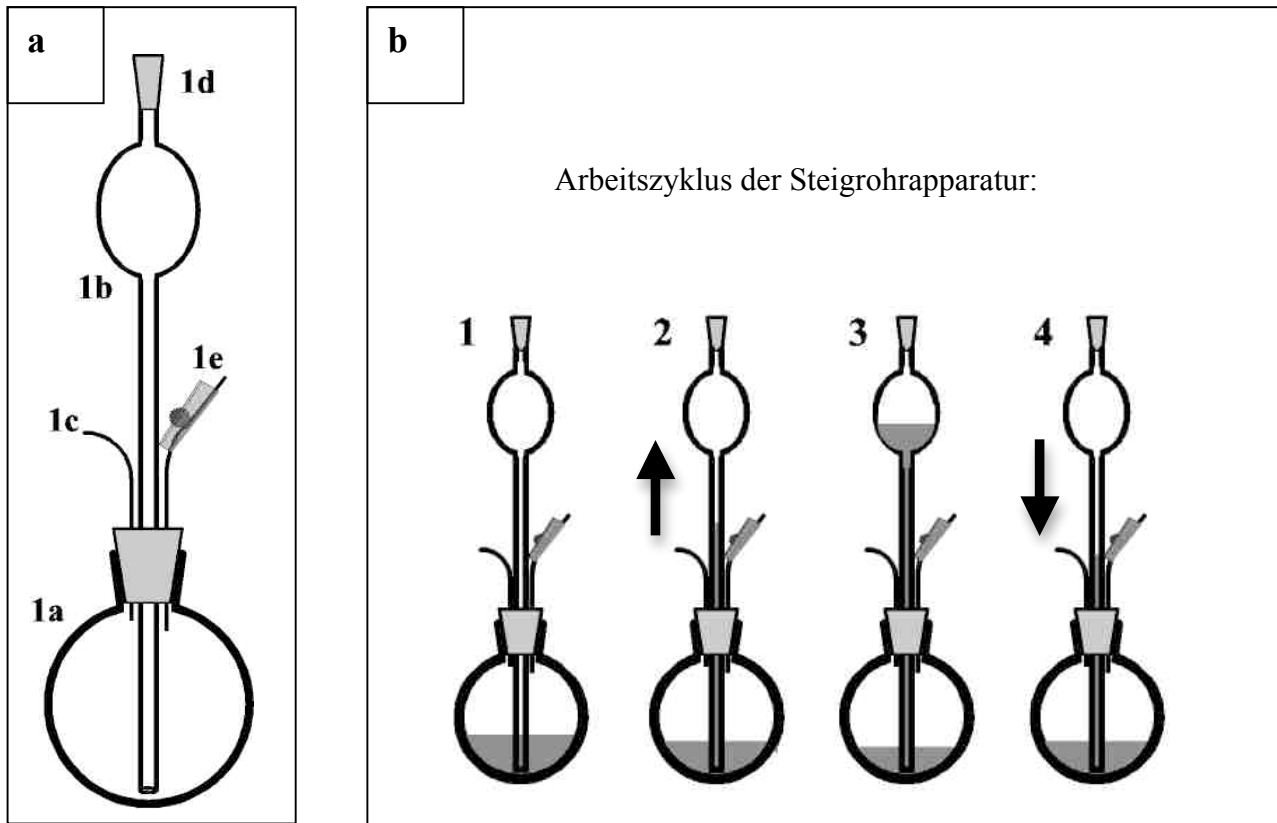


Abb. 1: Steigrohrapparatur zur Nachverdauung in Analogie zur erstmalig in der Dissertation von M. Thallmair²⁴ beschriebenen Apparatur. Teilbild a: 1a: Rundkolben 500 ml; 1b: Steigrohr mit Aufweitung; 1c: Gasanschluss; 1d: Druckausgleich mit Filter; 1e: regulierbarer Druckablass; Teilbild b: Ein Arbeitszyklus der Apparatur. Die Gewebe- bzw. Zellsuspension wurde in einem Zyklus unter Gasdruck zunächst durch ein enges Glasrohr in eine Aufweitung des Rohres gedrückt und floss nach Wegnahme des Gasdruckes von dort aus wieder in das Ausgangsgefäß zurück.

2.9.2. Gewinnung stark angereicherter Zellsuspensionen als Ausgangspräparate für venuläre und arterioläre Endothelzell- bzw. Perizytenkulturen

Nach Abschluss der Enzymzirkumfusion wurden die verwendeten Proteaselösungen nicht wie in früheren Versuchsreihen verworfen, sondern in den jeweiligen Enzymgefäßen (2 bzw. 2' in **Abb. 8**, Seite 30) gesammelt und weiter aufgearbeitet. Dazu wurden sie getrennt in Falcontubes aufgenommen, durch Zentrifugation (10 Minuten, 800 Umdrehungen/Minute) mehrfach gewaschen, ausgesät und als „**Enzymfraktion 1** (aus Gefäß 2) bzw. **2** (aus Gefäß 2')“ bezeichnet.

Auch bei der enzymatischen Dissoziation von Kleintierherzen wurde die verwendete Proteaselösung analog aufgearbeitet, hier entfiel jedoch die Auftrennung in zwei verschiedene Fraktionen.

Aus der im Rahmen der proteolytischen Zerlegung des Myokards gewonnenen Zellsuspension (siehe 2.9.1.1. und 2.9.1.2., Seite 10 bzw. 12) wurden zwei weitere Zellfraktionen gewonnen, die **Myokardfraktionen 1** und **2**.

Als erster Schritt hierzu wurde die Dichte der Zellsuspension bestimmt. Mit 90-prozentigem Percoll ($1,117 \text{ g/cm}^3$) konnte diese Suspension dann in einem Falcontube exakt auf eine Dichte von $1,052 \text{ g/cm}^3$ eingestellt und mit 4 ml 90-prozentigem Percoll unterschichtet werden. Nach Zentrifugation für 10 Minuten bei 800 Umdrehungen/Minute wurden die untersten 4 ml (das 90-prozentige Percoll) und die direkt aufliegende Schicht (die sedimentierten Zellen und Mikrogefäße) abgesaugt, im Verhältnis 1:5 mit *PBS* verdünnt und erneut zentrifugiert. Das Zellsediment wurde noch einmal mit *PBS* gewaschen, als „**Myokardfraktion 1**“ bezeichnet und in Kultur gebracht.

Die im Ausgangszentrifugentube verbliebene Percoll/Zell-Suspension wurde mit *HES* auf eine Dichte von $1,039 \text{ g/cm}^3$ eingestellt, wiederum mit 4 ml 90-prozentigem Percoll unterschichtet analog zur **Myokardfraktion 1** aufgearbeitet und schließlich als „**Myokardfraktion 2**“ bezeichnet.

2.9.3. Gewinnung reiner Zellkulturen endothelialen oder perizytären Ursprungs durch verschiedene zellkultivatorische Methoden

2.9.3.1. Isolierung venulärer Endothelzellen

Im Folgenden werden drei Methoden zur Isolierung venulärer Endothelzellen vorgestellt.

Mechanische Reinigung von venulären Endothelzellkolonien aus kreisförmig angelegten Zellkulturen

Als Ausgangspunkt dienten jeweils die Zellgemische, die aus den **Enzymfraktionen 1** und **2** abzentrifugiert worden waren (Definition siehe 2.9.2., Seite 15). 10 μl einer Zellsuspension von ca. 10 Zellen/ μl wurden in die Mitte einer Kulturschale als möglichst kleine Kreisfläche aufgetragen (\varnothing ca. 3-5 mm). Um trotz der geringen Flüssigkeitsmenge ein Austrocknen zu verhindern, empfahl es sich, ca. einen halben Milliliter Medium entlang des Schalenrandes auszubringen. Wenn die Zellen über

Nacht am Schalenboden anhafteten, konnte die Kulturschale gründlich gespült und anschließend mit Medium aufgefüllt werden.

Nach vier Wochen Kultivation bei wöchentlichem Mediumwechsel wurde der inzwischen um die zentral entstandene Endothelkolonie gebildete Saum aus Perizyten mit Hilfe eines sterilen, über dem Bunsenbrenner aus einer Pasteurpipette ausgezogenen feinen Glasspatels unter mikroskopischer Kontrolle ausgeschabt (siehe folgende **Abb. 2**).

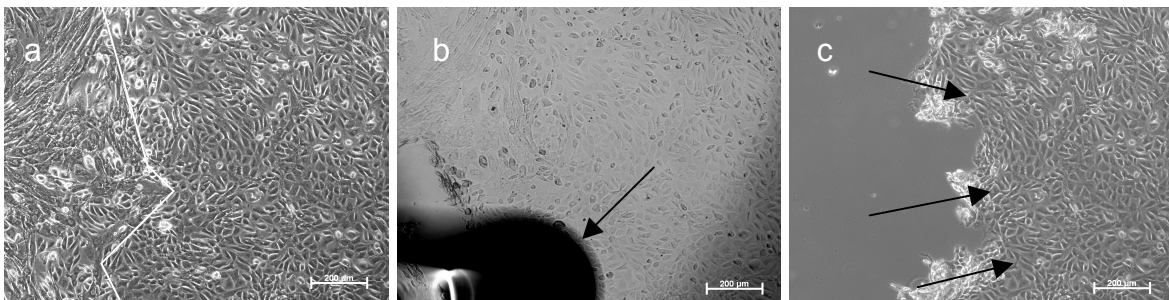


Abb. 2: Entfernung von Perizyten im Randbereich einer Endothelkultur venulären Ursprungs mit einem sterilen Glasspatel. a: Das Ausgangsbild zeigt den Übergangsbereich einer kreisförmig angelegten Zellkultur: rechts Endothelzellen, links Perizyten; b: Mechanische Reinigung mit einem sterilen Glasspatel (schwarzer Pfeil); c: Zustand der Kultur nach erfolgter Reinigung: die Endothelzellen (schwarze Pfeile) verbleiben, die Perizyten sind durch Schaben erfolgreich entfernt worden. Der Messbalken entspricht jeweils 200 µm.

Nach gründlichem Spülen mit *PBS* konnten die so gereinigten Kulturen enzymatisch abgelöst, nochmals kreisförmig ausgesät und die Reinigungsprozedur nach Erreichen der Konfluenz analog ein zweites Mal durchgeführt werden.

Spezifische Ablösung der Perizyten aus Mischkulturen mit Dispase II - Lösung

Zellgemische der **Myokardfraktion 1**, **Enzymfraktion 1** oder **2** wurden zur Gewinnung reiner Endothelkolonien bei wöchentlichem Mediumwechsel zunächst über 16 Wochen ausschließlich in *Mischmedium* kultiviert.

Danach erfolgte die Ablösung der Perizytensäume um die entstandenen Endothelkolonien mit Hilfe einer *Dispase II Lösung*. Dazu wurden die ausgewählten Kulturen zunächst gründlich mit *PBS* gewaschen, und dann für 30 Minuten bei 37°C mit *Dispase II-Lösung* inkubiert. Die so behandelten Schalen konnten dann in der Sterilbox schräg aufgestellt und mit Hilfe von sterilen Einwegspritzen mit aufgesetzter 20 G-Kanüle mit hinreichend scharfem Strahl abgespritzt werden. Die Waschlösung wurde gleichzeitig über eine Vakuumpumpe abgesaugt.

Dann wurden die verbliebenen Endothelkolonien mit frischem Wachstumsmedium versorgt und weiter kultiviert. Zu einem späteren Zeitpunkt konnte analog ein zweites Mal nachgereinigt werden.

Spezifische Ablösung der Perizyten aus Mischkulturen mit Protaminchlorid - Lösung

Diese Methode war der Reinigung mit Dispase II vom Prinzip her sehr ähnlich und ging von gleichartigen Zellkulturen aus.

Während der Reinigungsprozedur wurden die Kulturen aber nun in *DMEM* mit Zusatz von 5 mg/ml Protaminchlorid für 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde dieses Medium vorsichtig abgesaugt und durch *Mischmedium* ersetzt. Nach zwei Stunden Regeneration konnte, wie oben beschrieben, über eine Spritze mit aufgesetzter 20 G-Kanüle gründlich mit *PBS* gespült und die Schale danach wieder mit *Mischmedium* aufgefüllt werden.

2.9.3.2. Isolierung arteriolärer Endothelzellen

Zu Endothelkulturen arteriolärer Herkunft gelangte man nur über ein speziell ausgearbeitetes Züchtungsprogramm, das im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelt wurde und deshalb im Ergebnisteil (3.3.3., Seite 39) nochmals genauer beschrieben wird. Ausgangspunkt waren in solchen Anwendungen Zellkulturen aus der **Myokardfraktion 1**. Bei wöchentlichem Medienwechsel wurden die Zellkulturen nach folgendem Protokoll inkubiert: Zunächst für 1 Woche in *Mischmedium*, dann 3 Wochen in *Gibco-Medium*, und schließlich nochmals für 12 Wochen in *Mischmedium*. Bei dem Wechsel von *Misch-* auf *Gibcomedium* (bzw. vice versa) wurde nach Entfernen des alten Mediums mehrfach mit *PBS* gespült, bevor das neue Medium zugegeben wurde.

Hochgereinigte arterioläre Endothelzellen konnten schließlich in *Mischmedium* auch subkultiviert und weiter vermehrt werden.

2.9.3.3. Isolierung von Perizyten

Die Isolierung von Perizyten erfolgte im Wesentlichen durch Ausschabung der zentralen Endothelkolonien aus speziell angelegten, kreisförmigen Mischkulturen (vgl. analoge Endothelreinigung 2.9.3.1., Seite 16). Als Ausgangskulturen empfahlen sich Mischkulturen, die durch Aussaat von **Enzymfraktion 2** oder **Myokardfraktion 1** etabliert worden waren. Mit der Züchtung von Perizyten in speziellen Gewebebezücht-Säulen wurde auch noch eine weitere Methode zur Gewinnung homogener Perizyten-Ernten etabliert, die sich gleichzeitig auch zu deren Massenkultivierung eignet. Diese methodische Entwicklungsarbeit wird daher an anderer Stelle genauer beschrieben (Seite 23 unter 2.9.5.2., bzw. Seiten 53-55 unter 3.5.2) .

2.9.4. Histologische Methoden

2.9.4.1. Enzymhistochemische Untersuchungen

Zur Vorbereitung für enzymhistochemische Untersuchungen wurden die entsprechenden Zellkulturen mehrfach mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschen, für eine Minute in Formaldehyd fixiert und anschließend wieder mehrfach mit NaCl-Lösung gespült.

Nachweis von Dipeptidyl-Aminopeptidase-IV (modifiziert nach Lojda²⁵):

Direkt vor der Anwendung wurden 4 mg Gly-Pro-4-Methoxy- β -Naphtylamid in 20 μ l DMF gelöst und anschließend mit 10 ml eiskaltem ES vermischt. Nun wurden 4 mg Fast Blue B zugegeben. Wenn sich eine gelbliche Farbe ausgebildet hatte, wurde die Lösung über einen Spritzenfilter (Porengröße 0,2 μ m) auf die zu färbenden Zellkulturen gegeben, der Schalenboden sollte gerade so bedeckt sein. Für 12 Stunden erfolgte die Inkubation unter Lichtausschluss bei 4°C auf dem Taumelschüttler. Danach hatte sich eine roter Farbstoff gebildet und die Präparate wurden mehrfach mit NaCl-Lösung gespült. In der Regel erfolgte dann eine Anfärbung auf alkalische Phosphatase.

Nachweis von alkalischer Phosphatase (modifiziert nach Ackermann²⁶):

Direkt vor der Anwendung wurde das Reaktionsgemisch aus 3 mM Naphtol-ASM-Phosphat und 1 mM Fast Blue BB in eiskaltem Veronalpuffer (pH 9,0) hergestellt und dann über einen Spritzenfilter mit 0,2 µm Porengröße auf die zu färbenden Zellkulturen gegeben, so dass der Schalenboden vollständig bedeckt war. Die Inkubation erfolgte für 12 Stunden bei 4°C und unter Lichtausschluss auf dem Taumelschüttler. Nach Abschluss der Färbungen wurden die Präparate mehrfach mit physiologischer NaCl-Lösung gespült und in Formaldehyd aufbewahrt.

2.9.4.2. Fluoreszenzhistologie

Die Fluoreszenzaufnahmen entstanden mit Hilfe eines Mikroskops (Axioscop, Zeiss) mit Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe und Filteraufsätze für drei Anregungsbereiche (365, 450-490 und 546 nm). Als Farbstoffe wurden DAPI (359/461), SYTOX® Green (504/523), FITC-konjugierte Primärantikörper (494/518), Sekundärantikörper mit den Fluorochromen Alexa Fluor® 350 (346/442), 488 (495/519) und 546 (556/573) sowie Dil markiertes acLDL (549/565) verwendet. In Klammern sind die jeweiligen Absorptions- und Emissionswellenlängen in nm angegeben.

Zu jeder Färbung wurden Negativproben ohne Primärantikörper durchgeführt.

Färbung auf PECAM, vWF, Thrombomodulin, Desmin, α-Aktin und tissue factor

Die ausgewählten Zellkulturen wurden zunächst in PBS mit 0,5% Glutaraldehyd und 4% Paraformaldehyd fixiert und anschließend über Nacht in Paraformaldehyd aufbewahrt. Anschließend erfolgte für 30 Minuten eine Permeabilisierung in 0,1% Triton X-100 und 0,1% Tween, anschließend eine weitere Inkubation für 10 Minuten in einprozentiger NaBH₄-Lösung. Die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper in PBS mit 3% BSA erfolgte für eine Stunde bei 37°C auf dem Taumelschüttler. Nach mehrfachen Waschen mit **PBS** mit 1% BSA und Triton-X-100 konnte analog die Inkubation mit dem Sekundärantikörper durchgeführt werden. Zur Visualisierung niedrig konzentrierter Antigene wie tissue factor wurde ein gegen den Sekundärantikörper gerichteter und mit dem gleichen Farbstoff markierter Tertiärantikörper eingesetzt. Bei Bedarf konnte der jeweiligen Antikörperlösung noch der Kernfarbstoff DAPI zugesetzt werden.

Nach Abschluss der Färbung wurden die entsprechenden Zellkulturschalen gründlich gewaschen und nach Herstellerangaben im SlowFade®-Light-Antifade-Einbettmedium eingedeckelt.

Dil-ac-LDL-Aufnahme:

Die entsprechenden lebenden Zellkulturen wurden in DMEM mit 1% FCS und 10 µg/ml Dil-acLDL für fünf Stunde bei 37°C inkubiert, anschließend gewaschen und fixiert.

2.9.5. Massenkultur von Perizyten

2.9.5.1. Massenkultur von Perizyten auf Mikrocarriern

Zur massenhaften Kultur von Zellen auf Mikrocarriern kam im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine spezielle Apparatur zum Einsatz, die von Prof. Nees am Physiologischen Institut entwickelt und von der Firma E. Bühler produziert und vertrieben wurde. Der folgenden **Abbildung 3** sind detaillierte technische Angaben zu entnehmen.

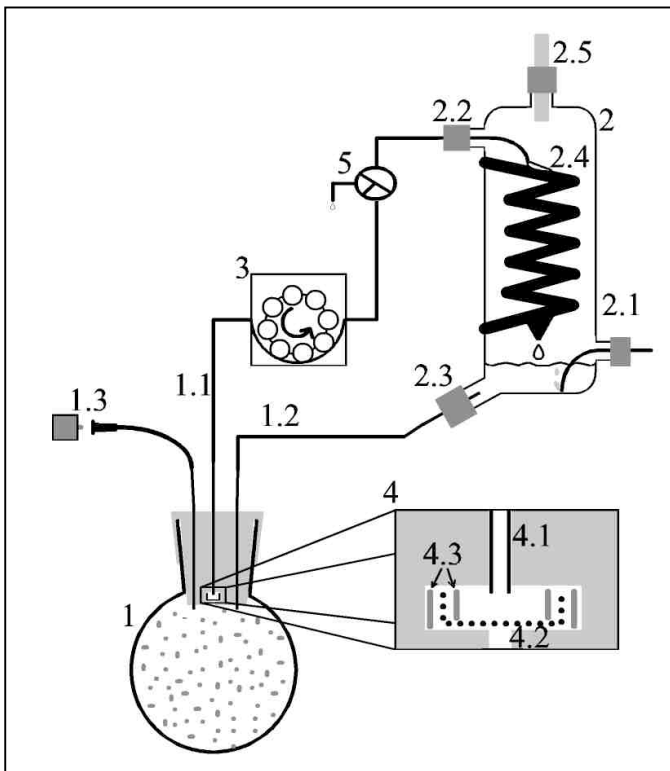


Abb. 3: Apparatur zur Zellmassenkultur auf Mikrocarriern. 1: Kolben mit suspendierten Mikrocarriern; 1.1: zentraler Kanal zum Absaugen von Medium, 1.2: lateraler Kanal für den Rückfluss des Mediums vom Begaser und 1.3: lateraler Kanal mit Spritzenanschluss und Verschluss, zur Probenentnahme und zum Nachfüllen von Medium; 2: Begaser mit 2. 1: Gaszulauf mit Regulation, 2.2: Mediumzufluss, 2.3: Mediumabfluss, 2.4 Wärmespirale und 2.5: Druckausgleich mit Filter; 3: Rollerpumpe; 4: Detailbild: Im zentralen Kanal befindet sich dem Abfluss (4.1) vorgeschaltet ein Sieb (4.2), das zwischen zwei Ringen (4.3) eingespannt ist; 5: Dreiwegehahn.

Der Aufbau sollte zur Vermeidung von Kontamination in einer Laminar-Flow-Box erfolgen. Zunächst wurden die für die Massenkulturen vorgesehenen Zellen gründlich mit *PBS* gespült, und anschließend mit *Trypsin/EDTA* bei 37°C inkubiert. Sobald die Zellen abgelöst waren, wurden sie in ein Falcontube aufgenommen, durch Zentrifugation (10 Minuten bei 800 Umdrehungen/Minute) mehrfach gewaschen und danach in *DMEM* resuspendiert. Währenddessen wurde die gewünschte Bead-Menge in einem sterilen 15 ml-Falcontube abgemessen und in den Kolben gefüllt. Der Verschlussstopfen wurde für diese Zeit auf ein steriles 50ml-Falcontube aufgesetzt, um den Innenteil darin vor Kontamination zu schützen. Nun wurde die Zellsuspension, die in der vorliegenden Versuchsreihe einer Zellzahl von circa 20×10^6 entsprach, zugegeben. Anschließend wurde der Kolben mit *DMEM* so weit gefüllt, dass sich der Stopfen problemlos wieder aufsetzen und schließen ließ. Bei senkrecht gestelltem Kolben wurde über den lateralen Kanal (Nr. 1.3 in **Abb. 3**, vorherige Seite) weiter Medium zugegeben, bis nahezu die gesamte Luft entwichen, Medium über den zentralen Kanal (Nr. 1.1 in **Abb. 3**) in den Begaser geflossen war und dort am Boden eine kleine Pfütze gebildet hatte.

Nun konnte der Aufbau im Wärme- und Schüttelschrank erfolgen. Die Befestigung der Kolben erfolgte mittels einer Überwurfschraube. Der Gaszulauf wurde so reguliert, dass die Mediumpfütze am Boden des Begasers sanft durchperlt wurde. Eine zu große Blasenbildung war dabei zu vermeiden. Mit Hilfe der Rollerpumpe wurde Medium über den zentralen Kanal (Nr. 1.1 in **Abb. 3**) aus dem Kolben gesaugt. Durch ein vorgeschaltetes 50 µm-Netz (siehe Detailbild 4 in **Abb. 3**) wurde das Einsaugen von Mikrobeads verhindert. Das abgesaugte Medium wurde nun in den Begaser gepumpt, wo es auf die Wärmespirale (Nr. 2.4 in **Abb. 3**) tropfte und an dieser entlang zum Boden lief. Von dort aus floss es von der Schwerkraft und dem Unterdruck im Kolben angetrieben über den Rückfluss durch den lateralen Kanal (Nr. 1.2 in **Abb. 3**) zurück in den Kolben.

Über die peristaltische Pumpe wurde die Flussrate des Mediums, über den Geschwindigkeitsregler die Stärke des Schüttelns reguliert. Über den zweiten lateralen Kanal konnte verbrauchtes Medium gegen frisches ausgetauscht werden.

Beim Abbau musste wiederum auf höchste Sterilität geachtet werden. Er sollte daher in einer Laminar-Flow-Box erfolgen. Zunächst wurde der jeweilige Begaser von der Gaszufuhr getrennt und der Schlauch aus der Rollerpumpe entfernt. Jetzt konnte auch der Kolben abgeschraubt und mit seinem Begaser in eine Sterilbank

transportiert werden. Dort wurde der Kolben geöffnet, die Beads steril entnommen und in Falcontubes überführt. Darin wurden sie mehrmals mit *PBS* gespült. Sobald keine Mediumspuren mehr zu sehen waren, konnte die Inkubation mit reichlich *Trypsin/EDTA* gestartet werden. Zum möglichst vollständigen Ablösen der Zellen sollte diese über 30 Minuten bei 37°C und regelmäßiger Resuspension erfolgen.

Zum Aufnehmen der abgelösten Zellen machte man sich die schnellere Sedimentation der wesentliche größeren Beads zu Nutze: Nach vollständigem Suspendieren wartete man ab, bis sich die Beads am Boden des Falcontubes sammelten, nahm rasch den Überstand mit einer sterilen Einwegpipette auf und sammelte ihn in einem weiteren Falcontube. In diesem befand sich nun der Großteil der abgelösten Zellen. Um die Ausbeute zu erhöhen, empfahl es sich, diesen Vorgang nochmals zu wiederholen.

Nun konnten die Zellen durch mehrfache Zentrifugation (10 Minuten, 800 Umdrehungen/Min.) gereinigt, in Medium resuspendiert und ausgesät werden.

2.9.5.2. Massenkultur von Perizyten in speziellen Wachstumssäulen

Dieses spezielle Verfahren wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit vollständig neu entwickelt und eignet sich sowohl zur Massenkultivierung als auch zur Isolierung von Perizyten. Nähere technische Einzelheiten zum Aufbau sind daher auch dem Ergebnisteil (**Abb. 30**, Seite 54) zu entnehmen.

Beim Zusammensetzen und Beimpfen der Säulen in einer Sterilbox war in höchstem Maße auf die Einhaltung der Sterilität zu achten.

Die Säulen bestanden aus durchsichtigem Plexiglas und hatten eine Länge von 20 cm und einen Innendurchmesser von 1,2 cm. In einem fraktionierten Vakuumverfahren mittels Ethylenoxid wurden sie am Klinikum München-Bogenhausen sterilisiert und in doppelter steriler Verpackung ins Labor transportiert. Die Sterilisation war bei diesem speziellen Verfahren nur im geöffneten Zustand der Säulen möglich. Daher mussten diese nach dem Öffnen der Verpackung in einer Laminar Flow Box zunächst wieder zusammengesetzt werden. Zum Aufbau der gesamten Apparatur wurde zuerst die Schlauchverbindung vom unteren Säulenende zur Vorratsflasche mit Zellkulturmedium hergestellt. Nun konnte Medium angesaugt und die Säule somit zu ca. einem Drittel gefüllt werden. Anschließend wurde die Zuleitung zunächst abgeklemmt, so dass kein retrograder Fluss mehr möglich war.

Der obere Säulendeckel wurde abgeschraubt und zweckmäßigerweise auf ein steriles Falcontube aufgesetzt, so dass das freie Schlauchende darin vor Kontamination geschützt war. Ebenfalls in einem sterilen Falcontube wurden ca. 7,5 ml (entspricht 5 cm Säulenhöhe und circa 1200 cm² Oberfläche) unbewachsener und vorgequollener Mikrobeads abgemessen, mit Medium in Suspension gebracht und über einen autoklavierten Glastrichter in die Säule gefüllt. Sobald diese sedimentiert waren, wurde überstehendes Medium mit einer sterilen Einwegpipette abgesaugt. Nun wurden ca. 2 ml schon mit Zellen einer Mischkultur bewachsener Mikrobeads vorsichtig überschichtet und anschließend nochmals mit einer 2 - 3 cm dicken Schicht unbewachsener Mikrobeads bedeckt. Der Deckel wurde geschlossen, die Spitze des abführenden Schlauches sollte gerade noch ins Medium eintauchen. Nun wurden die anderen Säulen entsprechend gefüllt. Zum besseren Handling empfahl sich eine Halterung, in der nicht bearbeitete Säulen nebeneinander in einer Klemmvorrichtung befestigt werden konnten.

In einem auf 37°C temperierten Brutschrank wurden die gefüllten Säulen und etwas darüber die Vorratsflasche befestigt, anschließend die abführenden Schläuche in eine Rollerpumpe eingelegt. Jetzt konnten sämtliche Klemmen entfernt und die Pumpe gestartet werden. Über diese wurde Medium am oberen Ende der Säule abgesaugt und durch frisches aus der Vorratsflasche vom Säulenboden her ersetzt.

Die Rollerpumpe wurde über eine Zeitschaltuhr gesteuert, über die Intervalldauer und -häufigkeit konnte die Flussmenge gesteuert werden. Auf diese Weise konnte eine Kultivierung der Zellen über mehrer Wochen erfolgen, an der Farbänderung des Mediums in den Säulen konnte der Wachstumsfortschritt beobachtet werden.

Wenn das gewünschte Wachstum erreicht war, konnten die Zellen geerntet werden. Hierzu wurde die jeweilige Säule aus der Apparatur herausgenommen, von außen durch ein 30-minütiges Bad in 2% Formaldehydlösung sterilisiert und anschließend mit einer sterilen Säge in zwei Teile geteilt, so dass die ursprüngliche Auftragungszone mit einem Sicherheitsabstand von mindestens 1 cm abgetrennt und verworfen wurde. Die Beads aus dem unteren Säulenteil wurden in einem Falcontube aufgenommen und analog zur bereits beschriebenen Technik (siehe Seite 23 unter 2.9.5.1.) aufgearbeitet.

2.9.6. Wachstumsbeobachtungen an lebenden Zellkulturen unter dem Mikroskop

Die zur Beobachtung ausgewählte Zellkultur wurde mit frischem Medium versehen und nach Auswahl des gewünschten Ausschnittes mittels Tapetenkleister auf dem Objekttisch fixiert. Über einen speziell entwickelten Mikroskopinkubator mit Gaszulauf wurden optimale Bedingungen mit 37°C und CO₂-Atmosphäre eingestellt. Mit Hilfe einer computergesteuerten Zeiss-Diavert-Mikroskopanlage, der entsprechenden Software (Zeiss Axio Vision 4.4) und einer automatisch gesteuerten Digitalkamera konnten in definierten Zeitabständen mikroskopische Aufnahmen gemacht und später zu Zeitrafferfilmen zusammengesetzt werden.

Ein in der Arbeitsgruppe um Prof. Nees speziell entwickelter Schalendeckel (siehe **Abb. 4**) ermöglichte den Austausch des Mediums unter weitestgehend sterilen Bedingungen und damit sehr lange Beobachtungszeiträume. Hierfür wurde das gesamte Mikroskop schräg gestellt, das Medium über einen Schlauch an der tiefsten Stelle abgesaugt und über einen zweiten Schlauch durch frisches ersetzt.

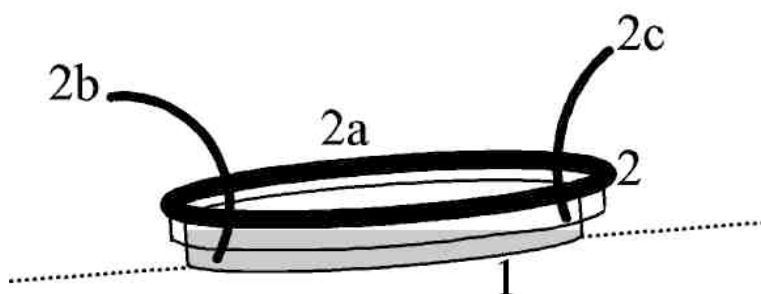


Abb. 4: Speziell angefertigter Schalendeckel für mikroskopische Wachstumsbeobachtungen. Entwicklung durch meinen Kollegen M. Geier²⁷. 1: Mit Medium gefüllte Zellkulturschale auf schräggestelltem Mikroskoptisch. Dessen Ebene wird durch die gepunktete Linie angedeutet. 2: Spezieller Schalendeckel mit 2a: integriertem Messingring zum Beschweren, 2b: Schlauchverbindung am tiefsten Punkt zum Absaugen und 2c: zweite Schlauchverbindung zum Auffüllen von frischem Medium.

3. Ergebnisse

3.1. Schaffung verbesserter apparativer und methodischer Voraussetzungen zur vollständigen und routinemäßigen proteolytischen Desintegration von Herzen verschiedener Spezies

1990 hat A. Dendorfer in seiner Inauguraldissertation²⁸ ein Perfusionssystem zur proteolytischen Dispergierung speziell von Meerschweinchenherzen beschrieben. Es folgten andere Doktorarbeiten aus der Arbeitsgruppe von Prof. Nees, die analoge Systeme für die Perfusion von Rinderherzen zum Einsatz gebracht haben^{11,29}. Ein zentrales Problem dieser Perfusionssysteme stellte die Gewährleistung einer möglichst homogenen Perfusion der jeweiligen Koronarsysteme dar. Bei isoliert perfundierten Herzspitzen kam es nämlich zu Quetschdrücken dieser Präparate in den zur Positionierung verwendeten Glastrichtern, so dass das Koronarsystem bei fortgeschrittener Proteolyse nicht in allen seinen Bereichen nachhaltig perfundiert wurde. Isolierte Herzen kleiner Tierspezies hingegen (Maus, Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen) wurden in der Apparatur nach A. Dendorfer - der Technik von O. Langendorff²³ folgend - an ihrer eigenen Aorta aufgehängt. Der durch das Eigengewicht bedingte Zug an den großen Koronargefäßen führte im Verlauf des proteolytischen Prozesses oft zu Einschränkungen der Myokardperfusion, und die Ausbeute an Mikrogefäßen und Kardiomyozyten war folglich nur klein. Wie zahlreiche Optimierungsversuche im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigten, kann dem zuverlässig vorgebeugt werden, wenn die an der endständigen Kanüle fixierten Herzen in eine Percoll-Lösung eingetaucht werden, welche eine angenähert gleiche Dichte ($1,047 \text{ g/cm}^3$) wie das Myokardgewebe besitzt. Dabei wird sichergestellt, dass das Koronarsystem zunächst durch einen, dem arteriellen Druck vergleichbaren, Perfusionsdruck mit Enzymlösung prall gefüllt wird. In diesem Füllungszustand verbleibt es auch dann noch, wenn die Perfusion anschließend bei niedrigem Druck flusskonstant mit einer geringen Pumprate (1ml/min) über längere Zeit zur proteolytischen Desintegration des Myokards fortgesetzt wird, wobei das Koronarsystem allerdings demselben Füllungsdruck ausgesetzt bleibt (s. **Abb. 5** auf der folgenden Seite). Dies setzt neben den im Bild gezeigten konstruktiven Merkmalen des Stopfens vor allem ein besonderes methodisches Vorgehen zu Beginn der Perfusion voraus, welches schon ausführlich im Methodenteil

beschrieben worden ist (2.9.1.1., Seite 10). So ergibt sich eine zuverlässige Verteilung und Erneuerung der Proteaselösung während der gesamten proteolytischen Zerlegung des Myokardgefüges, selbst wenn das Koronarsystem nur noch mit geringer Geschwindigkeit perfundiert wird. So kann die früher praktizierte Rezirkulation der vorgegebenen Proteaselösung umgangen werden. Dadurch war es in früheren Ansätzen oft zur Verstopfung ganzer Koronargefäßäste durch Debris und abgelöste Zellen gekommen und die Ausbeute an Myokardkomponenten war dementsprechend oft gering gewesen.

Die folgende Abbildung zeigt die im Rahmen der vorliegenden Arbeit modifizierten experimentellen Aufbauten im Überblick.

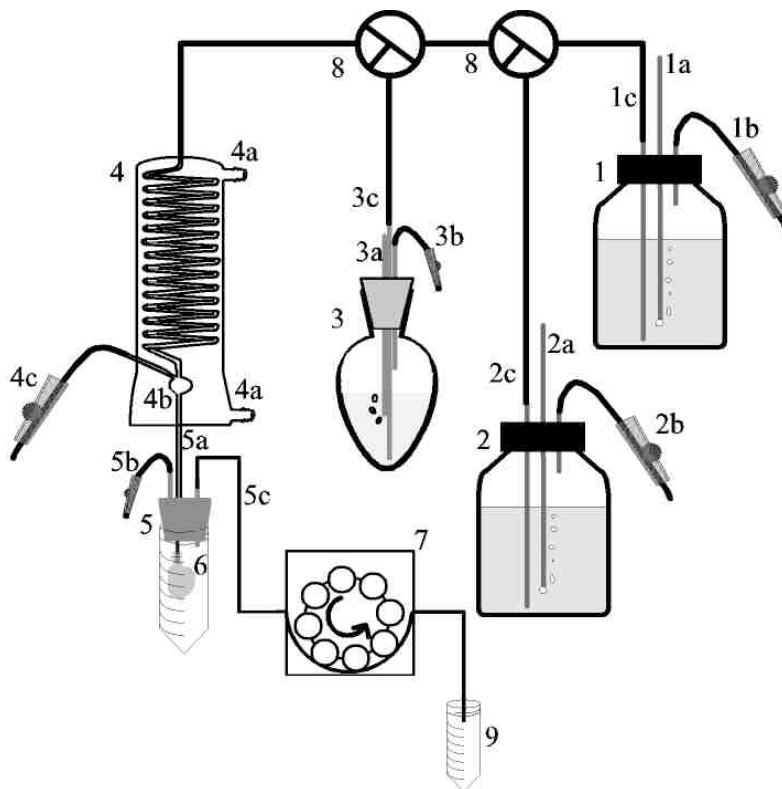


Abb. 5: Apparatur zur enzymatischen Dissoziation von Kleintierherzen. 1: Gefäß mit KHM + 2,5 mM Ca^{++} : a: Gasanschluss, b: Druckregulation, c: Anschluss an Durchlauferhitzer; 2: Gefäß mit KHM + 10 μM Papaverin: a: Gasanschluss, b: Druckregulation, c: Anschluss an Durchlauferhitzer; 3: Gefäß mit Proteaselösung II: a: Gasanschluss, b: Druckregulation, c: Anschluss an Durchlauferhitzer; 4: Durchlauferhitzer: a: Warmwasserzu- bzw. abfluss, b: Blasenfänger, c: Ablassventil für Luftblasen; 5: Gefäß mit steriler Percoll-Lösung: a: Zulauf aus Durchlauferhitzer, b: Druckregulation, c: Abfluss; 6: Kleintierherz, an der in die Aorta eingeführten Kanüle aufgehängt, in Percoll-Lösung der Dichte $1,047 \text{ g/cm}^3$ quasi schwebend; 7: Peristaltische Pumpe; 8: Drei-Wege-Hähne; 9: steriles Falcontube zum Auffangen des Perfusats.

Aufgrund der verwendeten Perfusionstechnik gelingt eine Dissoziation des gesamten Myokardgewebes, dessen Gewicht bei den 300 - 400 g schweren Tieren bei ca. 2 g liegt. Man erhält eine komplexe Gefäß- und Zellsuspension, aus der sich durch die Aufarbeitung mittels der Percolldichte-zentrifugation ca. $1,5 \times 10^6$ vitale und teilungsfähige Endothelzellen und etwa genau so viele Perizyten ernten und in Kultur bringen lassen.

Bei der Perfusion von Herzspitzen großer Tiere, wie z.B. von Rindern, wird eine homogene Perfusion der Präparate vor allem dadurch sichergestellt, dass die Kanülierung von mehreren prominenten Koronararterienzweigen sorgfältig durchgeführt und die Abdichtung aller größeren Arterienöffnungen auf der Schnittfläche der Präparate so vollständig wie möglich vorgenommen wird (**Abb. 6**). Dies geschieht durch Ligierung bzw. lokale Koagulation aller erkennbar angeschnittenen Arterienäste mit einem chirurgischen Elektrokauter. Die besondere Formgebung des Durchlauferwärmers ermöglicht es, die Perfusionsflüssigkeit luftblasenfrei auf bis zu vier verschiedene Koronararterien-segmente zu verteilen.

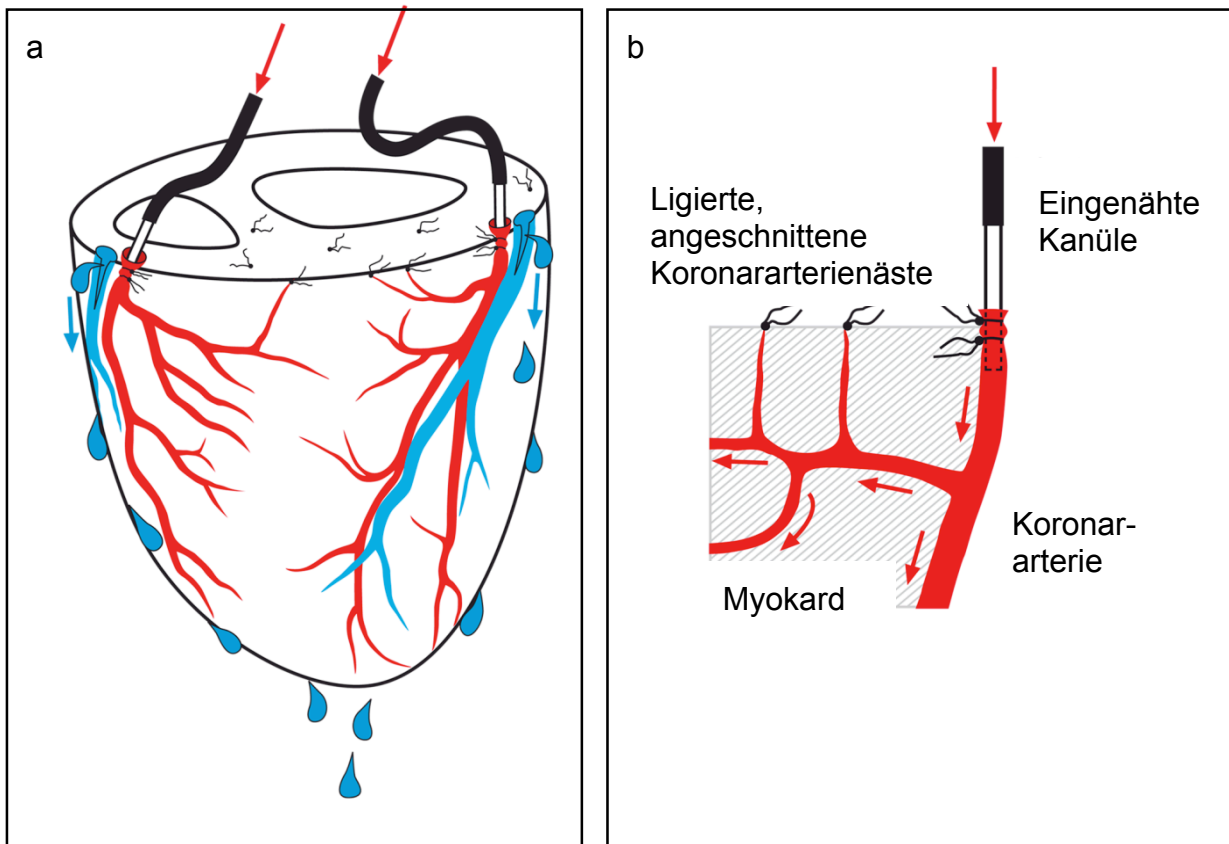


Abb. 6: Präparative Vorbereitung von Spitzen großer Herzen zur proteolytischen Desintegration. Sowohl im Übersichtsbild a als auch in Detailbild b sind die eingenähten Kanülen in den Koronararterien und deren ligierte Seitenäste an der Schnittfläche dargestellt.

Für die gezielte proteolytische Desintegration der Ventrikelmuskulatur müssen die Herzspitzen nicht einfach wie früher in den zum Auffangen des Perfusats notwendigen sterilen Trichter gelegt, sondern zunächst im Haltering und mit zusätzlichen Haltefäden fixiert und dann in dem Trichter frei schwebend eingehängt werden (**Abb. 7**, Seite 30).

Das für komplette Kleintierherzen optimierte Perfusionsverfahren (s. oben) erwies sich bei so großen Präparaten wie Rinderherzspitzen als nicht praktikierbar. Aus Kostengründen durfte zudem die durch das Koronarsystem geflossene Proteaselösung nicht verworfen werden. Die Lösung mußte also trotz der bereits erwähnten Verstopfungsgefahr rezirkuliert werden. Dieses hauptsächlich durch abgelöste Endothelzellen venulärer Herkunft verursachte Problem kann in der auf **Abbildung 7** (folgende Seite) gezeigten Apparatur aber durch die Inkorporation eines zweiten Enzymbehälters in das Perfusionssystem klein gehalten werden. So wird nach der Hälfte der proteolytischen Desintegrationszeit (wenn praktisch alle venulären Endothelzellen schon abgelöst sind) auf frisches Enzym umgeschaltet und eine weitere Verstopfung des Koronarsystems stark reduziert.

Unter Verwendung der oben beschriebenen Ansätze zur verbesserten proteolytischen Dispergierung von Herzen waren diverse Mitarbeiter der Arbeitsgruppe um Prof. Nees in der Lage, Kardiomyozyten und Mikrogefäße aus Herzen sehr unterschiedlicher Versuchstiere (Maus, Ratte, Hamster, Meerschweinchen, Kaninchen, Hausschwein und Rind) und sogar aus Menschenherzen (im Verlauf von Herztransplantationen explantierte Patientenherzen) zu isolieren. In systematischen Wachstumsstudien dieser Kollegen zeigte es sich dann, dass Zellen mikrovaskulären Ursprungs, vor allem deren Perizyten, eine starke Abhängigkeit von speziesspezifischen Wachstumsfaktoren haben, die offenbar nur im Serum von Feten der jeweiligen Spezies in hoher Konzentration und Spezifität enthalten sind³⁰. Die leichte Verfügbarkeit von FCS ist der Grund, warum bei allen weiterführenden Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit ausschließlich Rinderherzen zur Isolierung der Endothelzellen und Perizyten verwendet wurden.

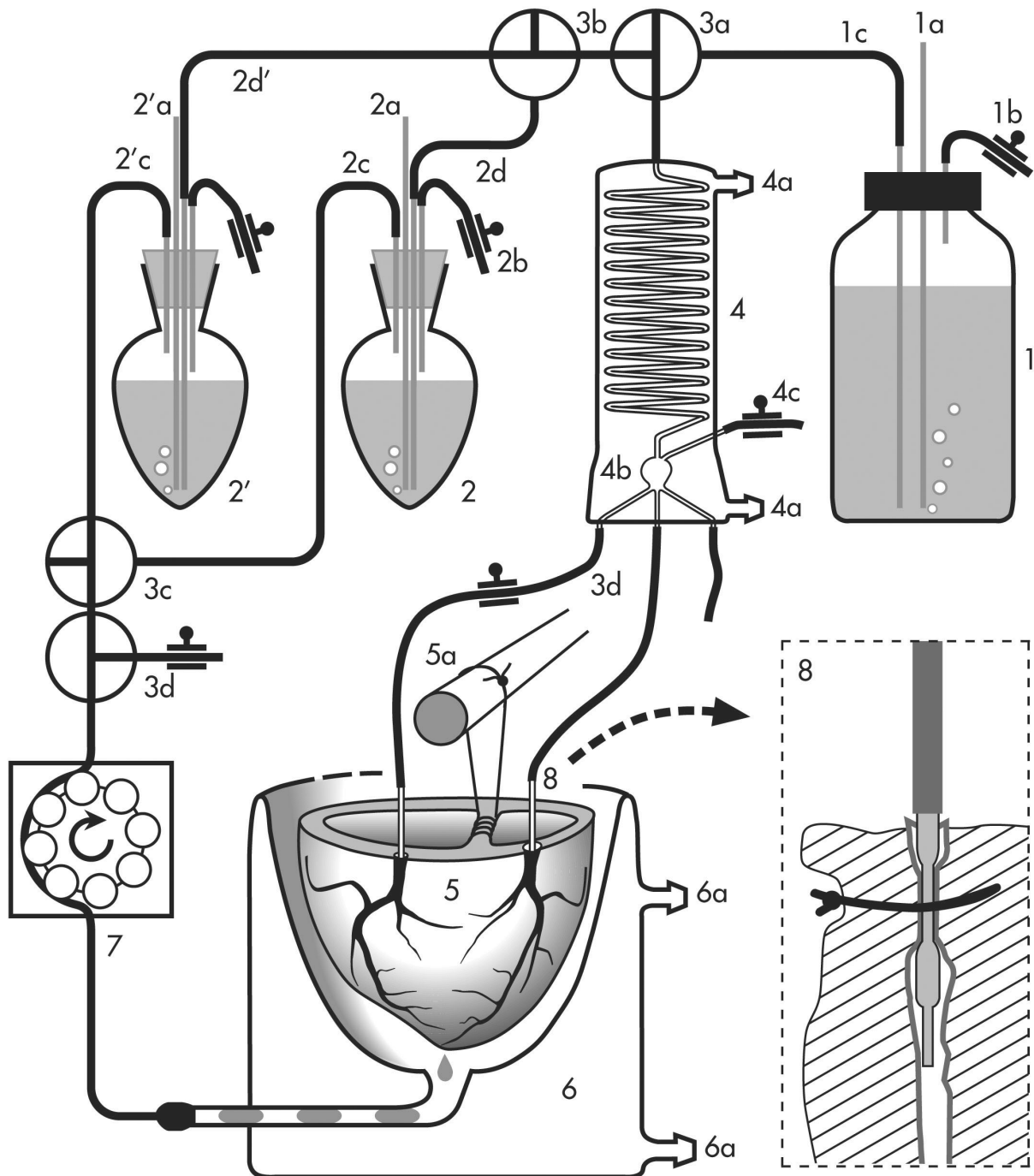


Abb. 7: Apparatur zur enzymatischen Dissoziation von Rinderherzen. 1: Gefäß mit KHM; a: Gaszufuhr, b: Druckregulation, c: Ableitung zum Durchlauferwärmer; 2/2': Gefäße für Proteaselösung; a: Gaszufuhr, b: Druckregulation, c: Zuleitung der perfundierten Proteaselösung, d: Ableitung zum Durchlauferwärmer; 3 a-d: Dreiwegehähne; 4: Durchlauferwärmer; a: Warmwasserzu- bzw. abfluss, b: Blasenfänger, c: Ablassventil; 5: aufgehängte Ventrikelspitze; a: Metallstange zum Aufhängen der Ventrikelspitze (Der zusätzliche Haltering ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht abgebildet); 6: speziell angefertigter Glastrichter; a: Warmwasserzu- bzw. abfluss; 7: Rollerpumpe; 8: Detailbild: ins Koronargefäß eingenähte Kanüle.

3.2. Suche nach einer einfachen Methode zur Gewinnung stark angereicherter Zellsuspensionen als Ausgangspräparate zur Isolierung von Endothelzellen und Perizyten aus Venulen und Arteriolen des Myokardgewebes

Von der wachsenden Erkenntnis der Arbeitsgruppe ausgehend, dass Venulen unter dem Einfluß von Proteasen besonders leicht zerfallen, bot es sich an, die Endothelzellen und Perizyten dieses Gefäßursprungs direkt aus der zirkumfundierten Proteaselösung zu gewinnen. Die entsprechenden Zellen aus den wesentlich stabileren und zunächst im Myokard verbleibenden Arteriolen sollten sich dagegen später aus der rohen Myokardsuspension durch Zentrifugation isolieren lassen, wenn man diese durch Zugabe von konzentrierter isotonischer Percoll-Lösung auf eine Dichte um $1,052 \text{ g/cm}^3$ einstellt. Es hatte sich nämlich in der Arbeitsgruppe gezeigt, dass intakte Arteriolen im Dichtegradienten gerade noch durch solche Dichtebereiche sedimentieren.

Systematische Fraktionierungsversuche vor diesem Hintergrund führten schließlich zu folgendem Fraktionierungsschema:

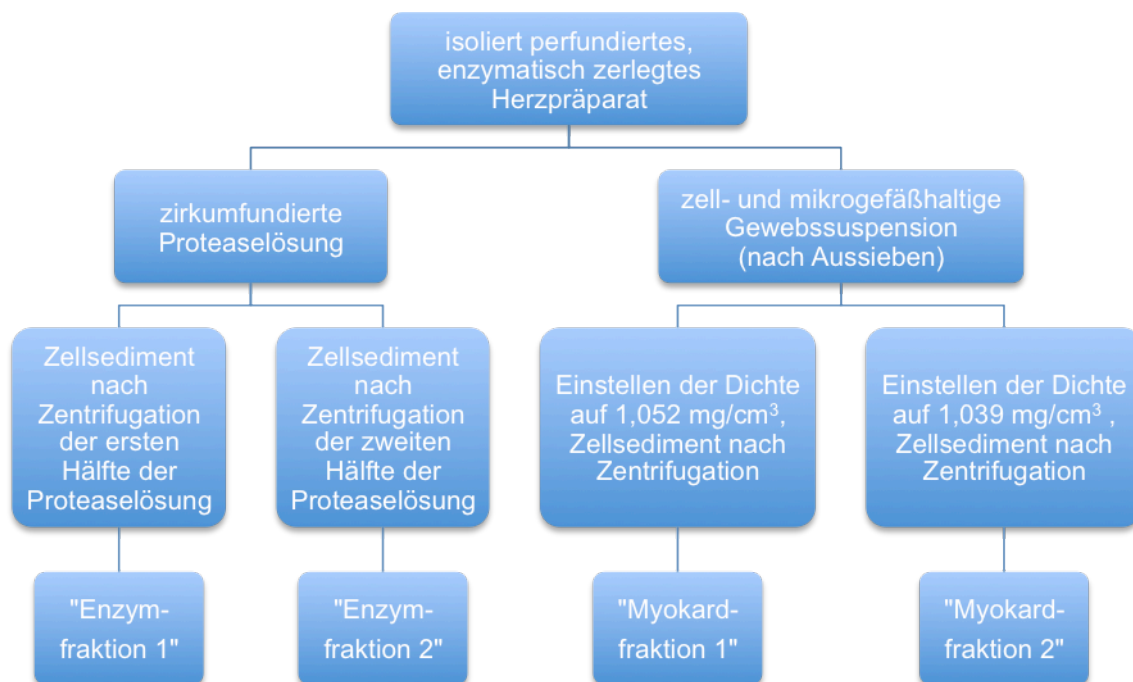


Abb. 8: Schematische Übersicht über die im Rahmen der vorliegenden Arbeit hauptsächlich untersuchten vier Zellfraktionen.

Routinemäßige enzymhistochemische Untersuchungen (Expression von DAP IV durch Endothelzellen, AP durch Perizyten) und mikroskopische Auszählungen machen deutlich, dass die in der **Enzymfraktion 1** vorhandenen Zellen zu $94\pm 6\%$ ($n=12$) aus Endothelzellen bestehen, der Rest der Zellen wird von Perizyten gebildet (siehe **Abb. 9**).

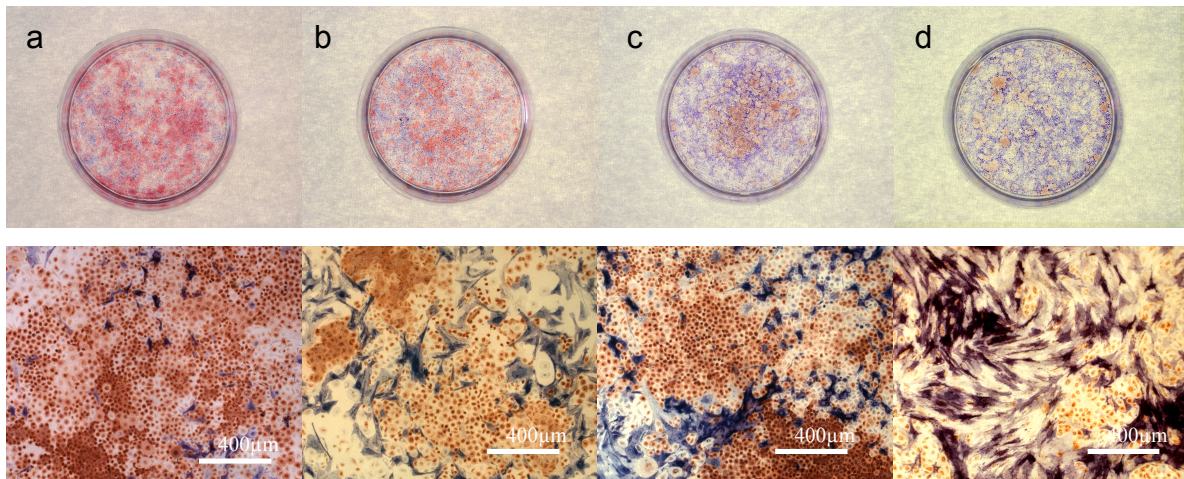


Abb. 9: Enzymhistochemische Charakterisierung der zur Isolierung venulärer Endothelzellen und Perizyten verwendeten Zellfraktionen. Anfärbung auf DAP-IV (rot) und AP (blau); Die Bilder a-d zeigen die betreffenden Petrischalen in der Übersicht, darunter zugeordnet befindet sich jeweils eine entsprechende Mikrophotographie (durchweg Hellfeldaufnahmen). a: **Enzymfraktion 1**, b: **Enzymfraktion 2**, c: **Myokardfraktion 1**, d: **Myokardfraktion 2**. Der Messbalken entspricht jeweils 400 µm.

Da in Enzymfraktion 1 keine Endothelzellen arteriolärer Herkunft nachweisbar sind (Identifizierung siehe 3.4.2., Seite 46), stammen die Ausgangszellen der entsprechenden Mischkulturen offenbar ausschließlich aus den koronaren Venulen ab. Die **Enzymfraktion 2** ist ähnlich zusammengesetzt, enthält aber relativ weniger Endothelzellen ($52\pm 7\%$, $n=12$), aber wesentlich mehr Perizyten (praktisch den prozentualen Rest der Zellen, die Verunreinigung mit Zellarten parenchymalen Ursprungs ist $<1\%$).

Auch Primärkulturen aus der **Myokardfraktion 1** enthalten noch größere Mengen an venulären Endothelzellen ($19\pm 12\%$, $n=12$), Perizyten in stark schwankenden Mengenanteilen ($41\pm 23\%$), und große Mengen Endothelzellen arteriolärer Herkunft (praktisch alle übrigen Zellen, parenchymale Zellen machten weniger als 4% aus). Die **Myokardfraktion 2** enthält dagegen kaum noch venuläre Endothelzellen, dafür aber viele Perizyten und arterioläre Endothelzellen (ohne DAP IV und AP-Aktivität, Kolonien daher in **Abb. 9** nicht sichtbar). Die starke Kontamination mit Zellen nicht-

vaskulärer Herkunft führte dazu, dass diese Fraktion im weiteren Verlauf der Arbeit keine Verwendung mehr fand.

3.3. Erprobung verschiedener methodischer Verfahren zur Gewinnung reiner Zellkulturen endothelialen und perizytären Ursprungs

Im Rahmen dieser Zielsetzung wurde zunächst Rückgriff auf ein im Rahmen der Doktorarbeit meines Kollegen G. Juchem²⁹ schon früher erprobtes mechanisches Reinigungsverfahren (steriles Ausschaben von konfluenten Kulturen) genommen, dessen Reproduzierbarkeit überprüft, durch mikroskopische Zeitrafferfilme zu erklären versucht, und im Hinblick auf die Isolierung größerer Zellmengen ausgebaut. Ein zweiter Ansatz bestand darin, Endothelzellen und Perizyten in primären Mischkulturen venulären Ursprungs nach Bildung ihrer typischen Kolonien durch Ausnützung spezifischer Unterschiede in ihrer Adhäsivität am Schalenboden zu trennen.

Schließlich wurde versucht, die in der **Myokardfraktion 1** erhaltenen Endothelzellen arteriolären Ursprungs durch eine für sie besonders günstige und speziell erprobte Kombination zweier Wachstumsmedien und einem speziell entwickelten Kultivationschema folgend zu selektiver Proliferation zu bringen.

3.3.1. Reinigung von Kulturen durch Ausschabetechnik

Als bevorzugtes Ausgangsinokulum für Kulturen, die mechanisch gereinigt werden sollen, dienten Zellernten der **Enzymfraktionen 1** und **2**. Es zeigte sich, dass man durch Zentrifugation dieser Lösungen und anschließendes vorsichtiges Suspendieren der Sedimente reproduzierbar jeweils homogen zusammengesetzte Klumpen von Endothelzellen oder Perizyten erhalten kann. Dies rührt daher, dass die beiden Zellarten unterschiedliche spezifische Dichten besitzen und sich deswegen bei der Zentrifugation in zwei übereinander liegenden Zellschichten absetzen (Endothelzellen auf dem Boden des Zentrifugenglases, Perizyten direkt darüber). Einzelaufnahme aus einem - zur Erforschung der betreffenden zell- und koloniearchitektonischen Grundlagen speziell angefertigten - Zeitrafferfilm (**Abb. 10**, Seite 35) zeigen exemplarisch das Proliferationsverhalten jeweils eines solchen

Endothel- und Perizytenklumpens. Die beiden Zellklumpen waren in diesem Experiment nach dem Aussäen zufälligerweise direkt nebeneinander am Schalenboden adhärent geworden. Die Bilderfolge macht das sehr typische Wachstumsverhalten der beiden Zellarten in Mischkulturen deutlich. Stets bilden sich schnell großflächige, kreisförmige Areale aus rasch proliferierenden, in sich nahezu homogen zusammengesetzten Endothelzellpopulationen aus. Diese drängen die in ihrer Peripherie befindliche Perizyten in klumpenförmige Areale zurück bzw. schränken die Perizytenklumpen in ihrem Wachstum stark ein (siehe **Abb. 10** auf der folgenden Seite).

Die resultierende Zellarchitektur der Mischkulturen kann besonders gut zur mechanischen Isolierung sehr reiner Endothelzellen oder Perizyten ausgenutzt werden, da sich die von ihnen gebildeten Gewebe schon im Phasenkontrast sehr klar unterscheiden und abgrenzen. Aus dem initial punktförmig ausgesäten Zellgemisch entwickeln sich im Verlauf von Wochen beide Gewebearten in Form konzentrisch angeordneter Kreisflächen mit charakteristischer Koloniearchitektur (siehe **Abb. 11**, Seite 36).

So kann anschließend mit Hilfe steriler Glasspatel hoch selektiv eine der beiden Zellarten aus der Schale entfernt werden (siehe **Abb. 2**, Seite 17). Die verbliebenen, wirkungsvoll gereinigten Zellen werden in Trypsinlösung abgelöst, in Medium resuspendiert, erneut punktförmig ausgesät und noch einmal auf die beschriebene Weise gereinigt. **Abbildung 12** (Seite 36) unterstreicht den Erfolg solcher Bemühungen am Beispiel von venulärer Endothelkulturen.

Die Kontaminationsgefahr ist bei diesem Reinigungsverfahren methodisch bedingt etwas höher als bei anderen Reinigungsverfahren. Bei sorgfältiger Vorgehensweise lassen sich Verunreinigungen durch Bakterien, Viren oder Pilze dennoch weitestgehend vermeiden. Nur ca. 5% der angelegten Kulturen mußten wegen mikrobieller Kontamination verworfen werden.

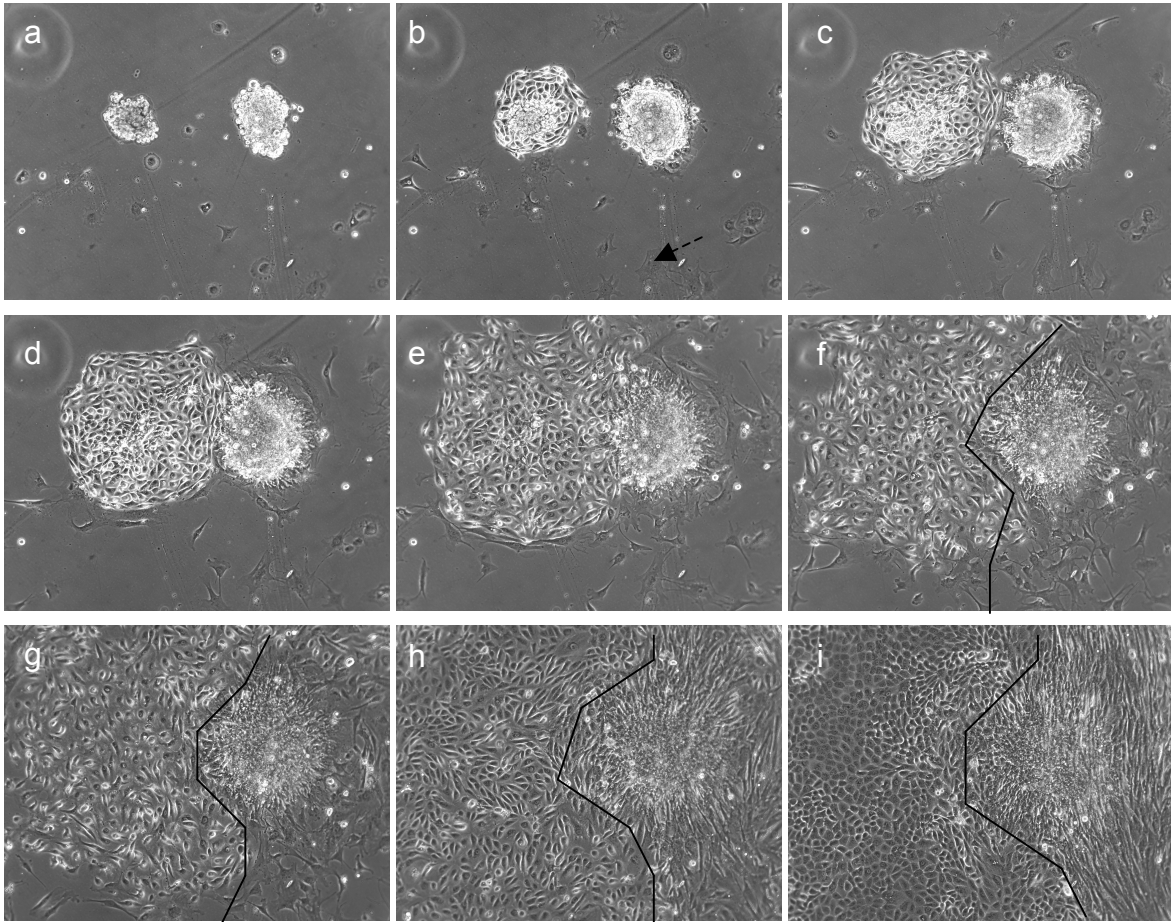


Abb. 10: Videokinematographische Beobachtung des Wachstums von Perizyten und Endothelzellen venulären Ursprungs. Phasenkontrastaufnahmen in 100 facher Vergrößerung. Dokumentiert ist der Verlauf über einen Beobachtungszeitraum von 90 Stunden: a: Ausgangsbild, b: nach 8 Stunden, c: nach 12 Stunden, d: nach 16 Stunden, e: nach 24 Stunden, f: nach 32 Stunden, g: nach 40 Stunden, h: nach 60 Stunden und i: nach 90 Stunden. Aus dem linken Zellklumpen in Ausgangsbild a entwickelt sich eine Endothelzellkolonie, aus dem rechten eine Perizytenkolonie. Eine Durchmischung findet nicht statt (klare Trennlinie in f-i eingezeichnet).

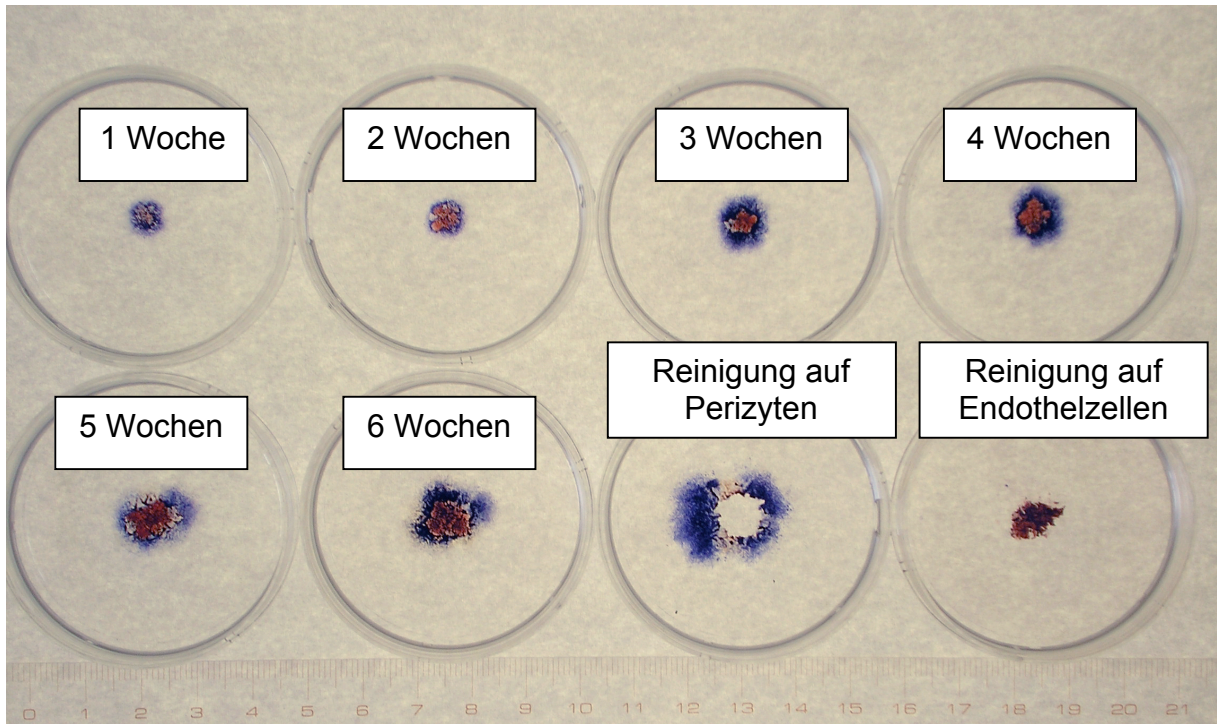


Abb. 11: Enzymhistochemische Anfärbung punktförmig angelegter Mischkulturen von Endothelzellen und Perizyten venulären Ursprungs während ihres mehrwöchigen Wachstums und jeweils eine exemplarische Perizytenkultur bzw. Endothelzellkultur nach mechanischer Reinigung (in den beiden letzten Schalen). Färbung auf DAP-IV und AP. Die rot gefärbten Endothelzellen organisieren sich im Zentrum zu einer weitgehend homogenen und geschlossenen Kolonie, die Perizyten (Blaufärbung) wandern in die Peripherie der Endothelkolonie. Bei den zwei letzten Schalen der unteren Reihe wurde vor der Anfärbung die jeweils nicht gewünschte Zellart ausgeschabt.

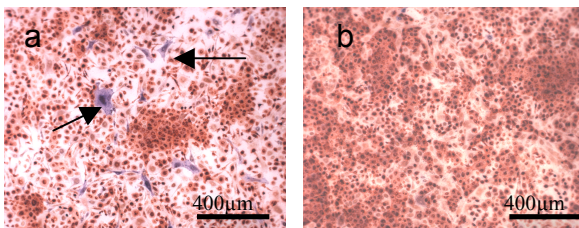


Abb. 12: Enzymhistochemische Charakterisierung von Endothelzellkulturen venulären Ursprungs, die durch Ausschabung der Perizyten gereinigt wurden. Anfärbung auf DAP-IV und AP: a: Nach einmaliger Reinigung verbleiben vereinzelte Perizyten (exemplarisch mit Pfeilen gekennzeichnet) b: Hochreine Endothelzellkulturen nach zweimaliger Reinigung.

3.3.2. Reinigung von Kulturen durch selektive Verminderung der Adhäsivität von Perizyten

Kultivierte Endothelkolonien haften bereits in Standardmedium besser am Schalenboden als Perizyten. Durch Modifikation der Inkubationsbedingungen gelang es im Rahmen der vorliegenden Arbeit, die schwache Adhäsivität der Perizyten weiter zu verringern und für Reinigungszwecke zu nutzen.

Zum einen bewährte sich dafür eine standardisierte, 0,01 % (w/v) Dispase II-Lösung, die 30 Minuten (37°C) einwirkte (siehe **Abb. 13**, Seite 38). Die Perizyten ließen sich anschließend mit Hilfe einer Pipette suspendieren und in Form kleiner Klumpen bzw. Zellaggregate absaugen. Nach scharfem Spülen mit HES und Absaugen blieben so in den Kulturschalen hochgereinigte Endothelzellen zurück, die sich rasch weiter kultivieren lassen. Nach wenigen Tagen wurde in der Ausgangsschale der konfluente Wachstumszustand und die vollständige Expression der typischen Endothel Eigenschaften wieder erreicht (siehe **Abb. 14**, Seite 38).

Ein ganz analoges Ergebnis ließ sich erzielen, wenn man die Mischkulturen (wieder bevorzugt aus den **Enzymfraktionen 1** und **2** etablierte und bis zur Konfluenz gezüchtete Zellkulturen) mit definierten Protaminchlorid-Lösungen inkubierte (siehe Seite 18 unter 2.9.3.1.).

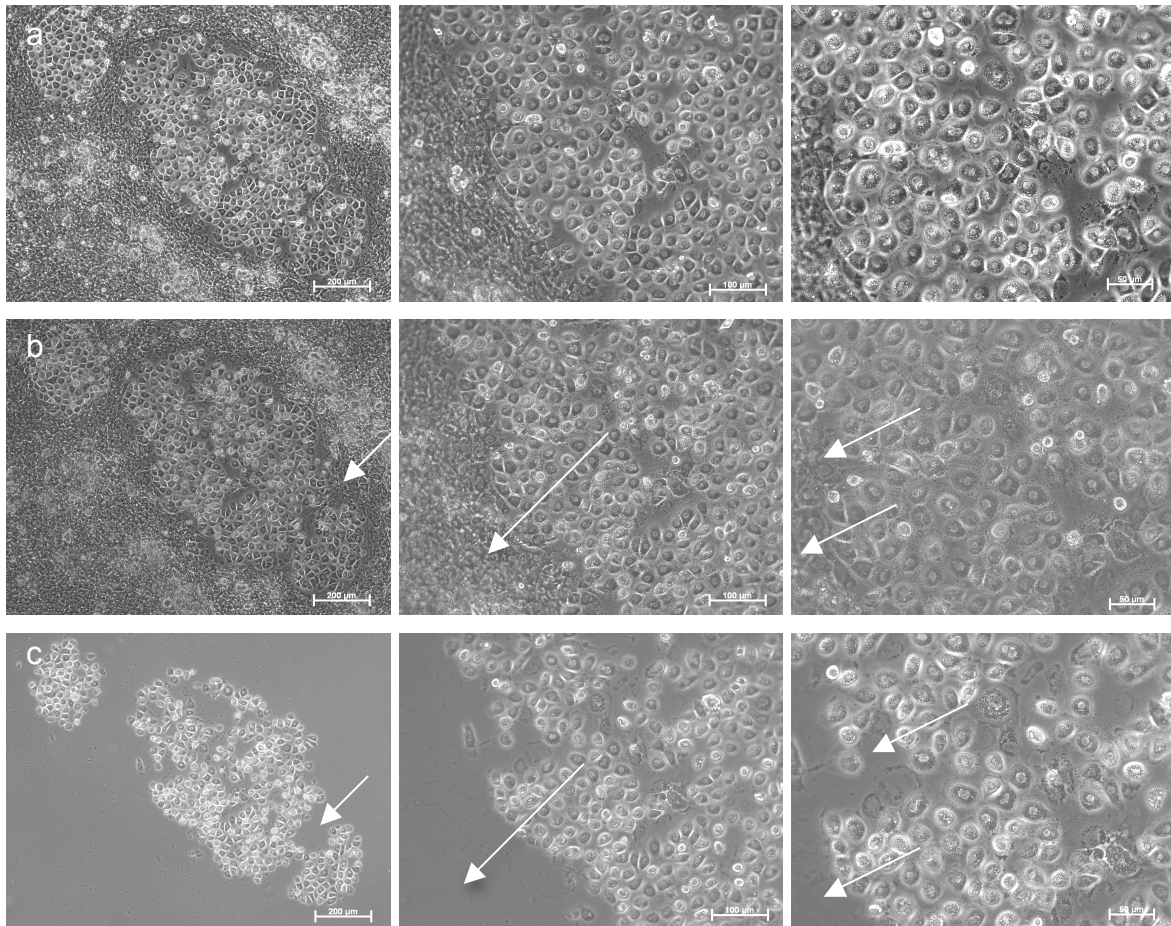


Abb. 13: Reinigung einer Mischkultur durch selektive Ablösung der Endothelzellen mit Dispase II – Lösung und anschließende Spülen mit HES. Phasenkontrastbilder, jeweils 3 Bilder mit zunehmender Vergrößerung. a: Ausgangskultur, b: nach 30 minütiger Einwirkung von Dispase II - Lösung, c: nach dem Spülen mit HES. Besonders bei hoher Vergrößerung ist zu erkennen, wie die Fremdzellen selektiv entfernt werden (weiße Pfeile in der Bildserie b). In Bildserie c sind nur noch Endothelzellen zu sehen, die weißen Pfeile markieren in diesem Fall nur noch die ursprünglichen Lokalisation von Fremdzellen (Perizyten).

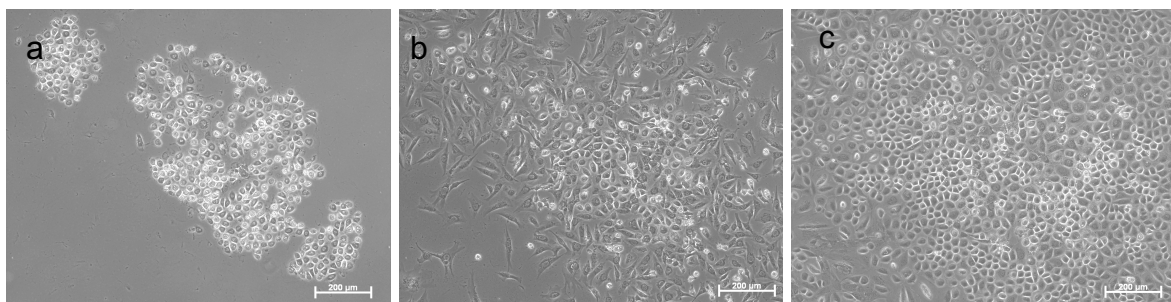


Abb. 14: Gewebearchitektur einer mit dem Dispase-Verfahren gereinigten Endothelzellkolonie. Die Phasenkontrastaufnahmen zeigen die identische Zellkultur aus Abbild 13c, a: direkt nach der Reinigung, b: nach 2 und c: nach 4 Tagen. In Teilbild c ist bereits wieder die typische Pflastersteinmorphologie des venulären Endothels zu erkennen. Der Messbalken entspricht 200 µm.

3.3.3. Selektive Proliferation arteriolärer Endothelzellen durch Kombination zweier Wachstumsmedien und Anwendung eines speziell erprobten Zeitprotokolles

Während sich die beiden bisher beschriebenen Reinigungsverfahren auf die Reinigung von Mischkulturen venulärer Herkunft beziehen, dient ein drittes, im Rahmen der vorliegenden Arbeit für routinemäßige Handhabung ausgearbeitetes Verfahren speziell der Etablierung von reinen Endothelkulturen arteriolärer Herkunft. Hier war die **Myokardfraktion 1** die bevorzugte Ausgangsbasis zur Etablierung von Primärkulturen (siehe **Abb. 8** und **9**, Seite 31 bzw. 32).

Das folgende, in **Abb. 15** schematisch dargestellte Kultivationsprogramm unter Verwendung von *Mischmedium* (durchgezogener Pfeil) und *Gibco-Medium* (gepunkteter Pfeil) hat sich in vielen systematischen Vorversuchen unter Variation der verwendeten Medien und Kultivationszeiten bewährt.

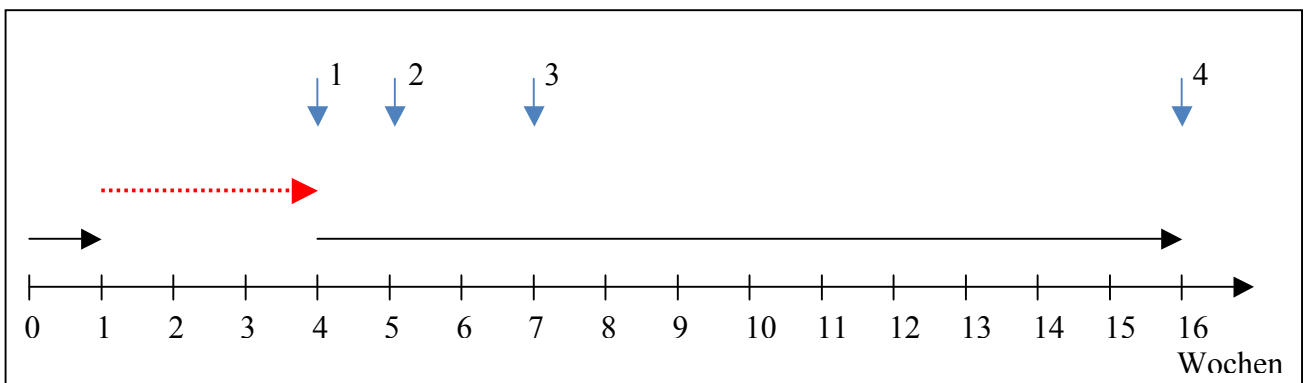


Abb. 15: Selektive Proliferation arteriolärer Endothelzellen durch planmäßigen Einsatz von *Mischmedium* (waagrechte schwarze Zeitspannen) und *Gibco-Medium* (roter gestrichelter Pfeil). Die blauen nummerierten Pfeile geben die Zeitpunkte an, zu denen Kulturen zur Charakterisierung der Zellarchitektur fixiert wurden (vgl. **Abb. 16, Seite 41).**

Nach einer Woche im *Mischmedium* hatten sich einzelne vitale Zellen am Schalenboden angeheftet, eine Koloniebildung war aber noch nicht zu beobachten. In diesem Stadium wurden die Zellkulturen nun in *Gibco-Medium* überführt. Dieses enthielt zum einen eine größere Proteinmenge (10% FCS im Vergleich zu 6%) und zum anderen zusätzliche Wachstumsfaktoren (siehe 2.8. Seite 10). Dies führte zu einer sehr schnellen, selektiven Proliferation der arteriolären und zur Abtrennung der venulären Endothelzellen (vermutlich durch mangelhafte Adhäsion). Nach nur drei Wochen (Zeitpunkt 1) waren die Schalen dicht bewachsen (**Abb. 16 a**, Seite 41), es kam sogar zur Ausbildung von dreidimensionalen Gewebewucherungen (**Abb. 16 b**).

Anschließend wurden die Kulturen wieder zurück ins *Mischmedium* überführt, welches in seiner speziellen minimalistischen Zusammensetzung besonders auf Endothelzellen ausgelegt war. Diese blieben unter den neuen Bedingungen teilungsfähig, nach einer Woche (Zeitpunkt 2, **Abb. 16 c und d**) zeigten sie die typische Zellmorphologie und breiteten sich unter Verdrängung anderer Zellarten immer weiter aus. Dabei versammelten sich die zugehörigen Perizyten ringartig um die zentralen Endothelkolonien, wie es bereits für die entsprechenden Zellen venulärer Herkunft beschrieben wurde. Die oben erwähnten, undefinierten Gewebewucherungen und Zellklumpen lösten sich mit der Zeit ab und wurden beim Medienwechsel automatisch entfernt.

Nach vier Wochen (Zeitpunkt 3, **Abb. 16 e**) waren bereits typische und ausgedehnte Kolonien arteriolärer Endothelzellen mit ihren umrandenden Perizyten zu sehen. Innerhalb der von Endothelzellen geformten Kolonien befanden sich nur noch vereinzelt die Reste sich abkapselnder Fremdzellen. Die **Abbildung 16 e** zeigt einige dieser Zellen, sie sind exemplarisch mit Pfeilen markiert. Auch die begleitenden Perizyten wurden zunehmend verdrängt und abgelöst.

Im weiteren Verlauf der Kultivation wiesen die Endothelbereiche reproduzierbare eine nahezu vollkommen homogene Zusammensetzung auf. Nach 12 Wochen im *Mischmedium* waren auch die Perizyten nahezu vollständig verschwunden und die arteriolären Endothelzellen lagen in einer Reinheit von circa 98% vor (**Abb. 16 f**).

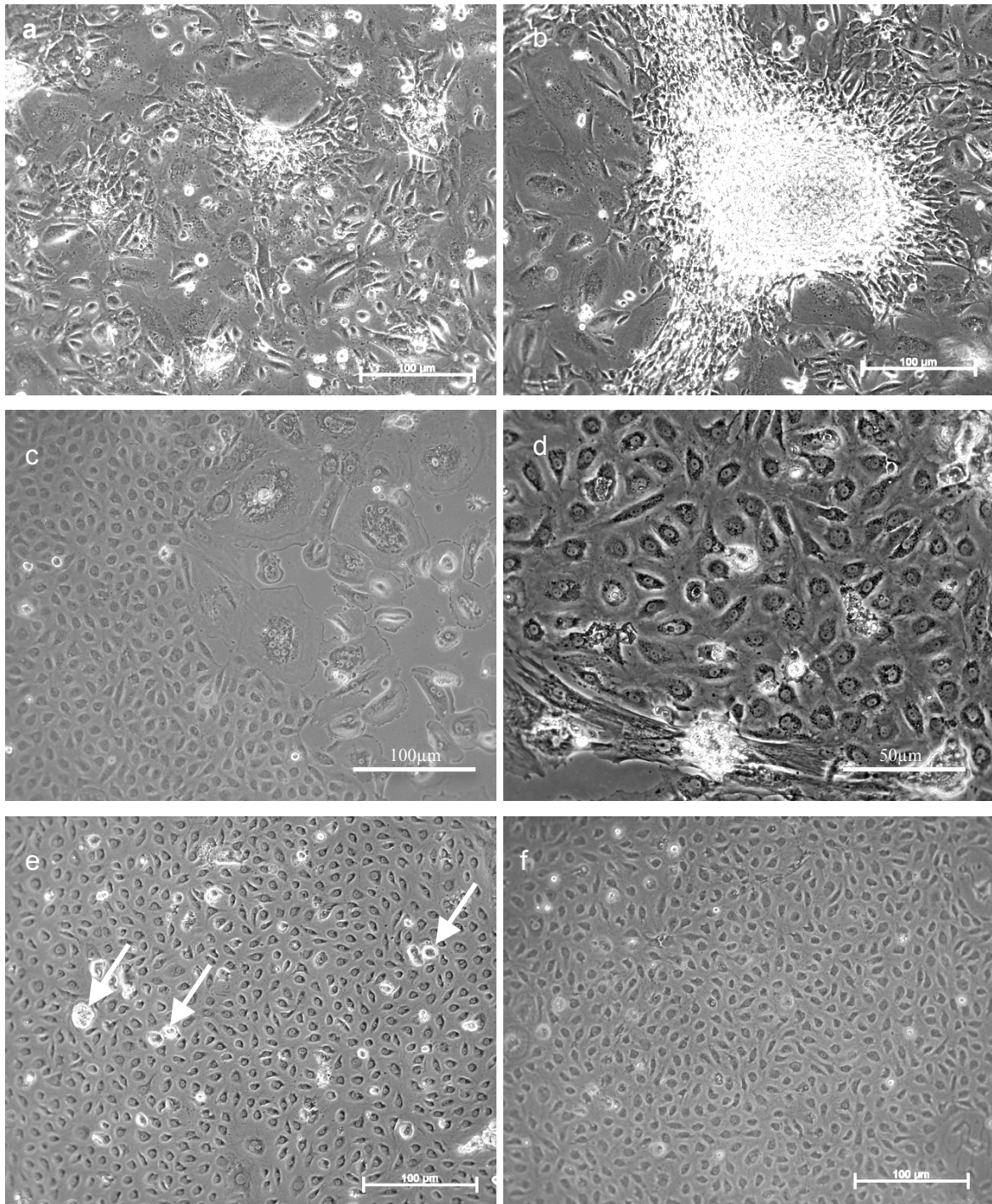


Abb. 16: Reinigung arteriolärer Endothelzellen aus initial komplex zusammengesetzten, aus der Myokardfraktion 1 abgeleiteten Mischkulturen durch Anwendung des im Rahmen der Arbeit entwickelten selektiven Kultivationsprotokolles. a und b: Typische Ausschnitte einer Kultur nach einwöchiger Kultur in Mischmedium und einer folgenden Kultivationsperiode von drei Wochen in Gibco-Medium (Zeitpunkt 1 im Schema der **Abb. 15**); c und d: Zustand der Kultur nach einwöchiger Weiterführung der Kultur in Mischmedium (Zeitpunkt 2); e und f: Typische konfluente Endothelgewebe arteriolärer Herkunft nach zwei (e, Zeitpunkt 3) bzw. elf weiteren Wochen (f, Zeitpunkt 4) in Mischmedium (vgl. Protokoll in **Abb. 15**). Durchweg Phasenkontrastaufnahmen.

3.4. Histologische Charakterisierung der erhaltenen Zellkulturen

3.4.1. Untersuchung von Zellen venulären Ursprungs

Abbildung 17 zeigt anhand einer reinen, unter Standardbedingungen wachsenden, noch nicht durchgehend konfluenten Kultur von venulären Endothelzellen, dass das typische Markerenzym Dipeptidylaminopeptidase IV (DAP IV) erst dann in maximaler Aktivität exprimiert wird, wenn die Zellen konfluent werden und damit eng von Nachbarn umgeben sind. Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule (PECAM) wird dagegen kaum an konfluenten Endothelzellen (linke obere Ecke der Bilder) exprimiert, in deutlicher Konzentration aber an proliferierenden.

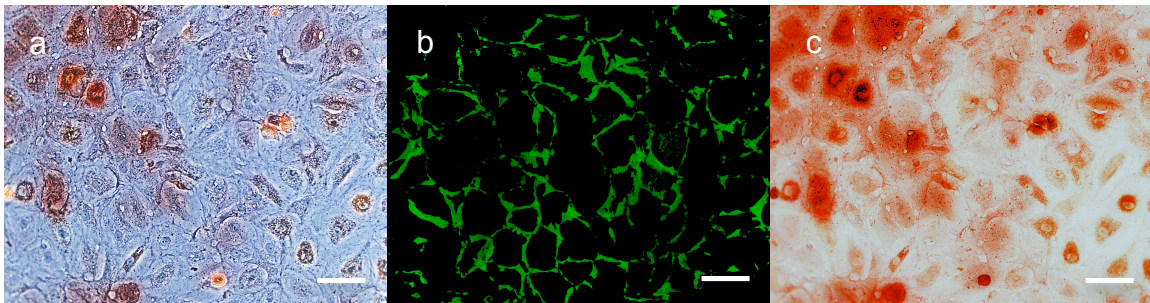


Abb. 17: Nachweis von DAP IV und PECAM in einer reinen Kultur venulärer Endothelzellen. a: Phasenkontrastbild einer gegen DAP IV gefärbten Kultur, b: Anfärbung auf PECAM, c: Hellfeldbild derselben Kultur; der Messbalken jeweils in der rechten unteren Bildecke entspricht 250 μm .

Abbildung 18 ist ein weiteres Beispiel dafür, dass proliferierende Endothelzellen sich von gleichen Zellen im konfluenten Gewebeverband bezüglich histologischer Marker unterscheiden. So wird fluoreszierendes acLDL deutlich rascher von proliferierenden venulären Endothelzellen (rechte untere Ecke der Bilder) aufgenommen als von den entsprechenden konfluenten Zellen.

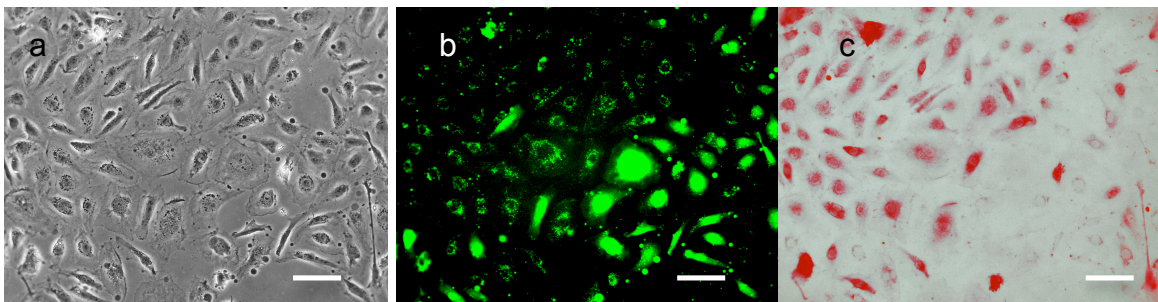


Abb. 18: Nachweis der Aufnahme von acLDL und Expression von DAP IV in einer reinen Kultur venulärer Endothelzellen. a: Phasenkontrastaufnahme der Kultur, b: Färbung gegen acLDL, c: Hellfeld nach Färbung gegen DAP IV. Der Messbalken in der rechten unteren Bildecke entspricht jeweils 250 μm .

Abbildung 19 zeigt anhand eines konfluent gewordenen, auf von Willebrand Faktor Antigen (vWF:Ag) und Thrombomodulin (CD141) angefärbten Gewebeverbandes venulärer Endothelzellen, dass diese bekannten und breit akzeptierten Endothelmarker auch am venulären Endothel überzeugend exprimiert werden.

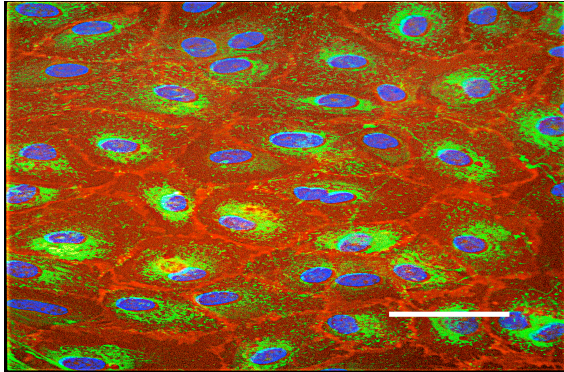


Abb. 19: Nachweis von vWF:Ag (grün) und CD141 (Thrombomodulin, rot) in einer Reinkultur konfluenter venulärer Endothelzellen. Der Messbalken im rechten unteren Bildrand entspricht 10 μm .

Abbildung 20 (Seite 44) zeigt, dass in Endothelzellen venulären Ursprungs auch typische Proteine des kontraktile Apparates nachweisbar sind, die in der Gefäßwand sonst nur in Perizyten, in besonders hoher Konzentration aber vor allem in glatten Muskelzellen vorkommen. Zu diesen Proteinen gehört Desmin (**Abb. 20 a-c**), das im hier gezeigten Beispiel einer sonst noch auf CD141 angefärbten Kultur in allen venulären Endothelzellen in geringer, aber doch deutlicher Konzentration nachweisbar ist, wenn lange genug belichtet wird. Auch glattmuskuläres α -Aktin wird in venulären Endothelzellen exprimiert, wenn auch viel schwächer als in den begleitenden Perizyten (**Abb. 20 d**). Wird nur sehr kurzzeitig belichtet, ist dieses kontraktile Protein auch in Perizyten aufgrund seiner relativ geringen Konzentration nicht mehr nachweisbar (im exemplarischen Bild g der **Abbildung 20** wuchern solche Zellen in großer Zahl zwischen den beiden Endothelkolonien). Hingegen erkennt man im selben Bildausschnitt einige wenige glatte Muskelzellen, die α -Aktin typischerweise in so hoher Konzentration exprimieren, dass es in der **Abb. 20 e** und **f** trotz der kurzen Expositionszeit strahlend rot imponiert.

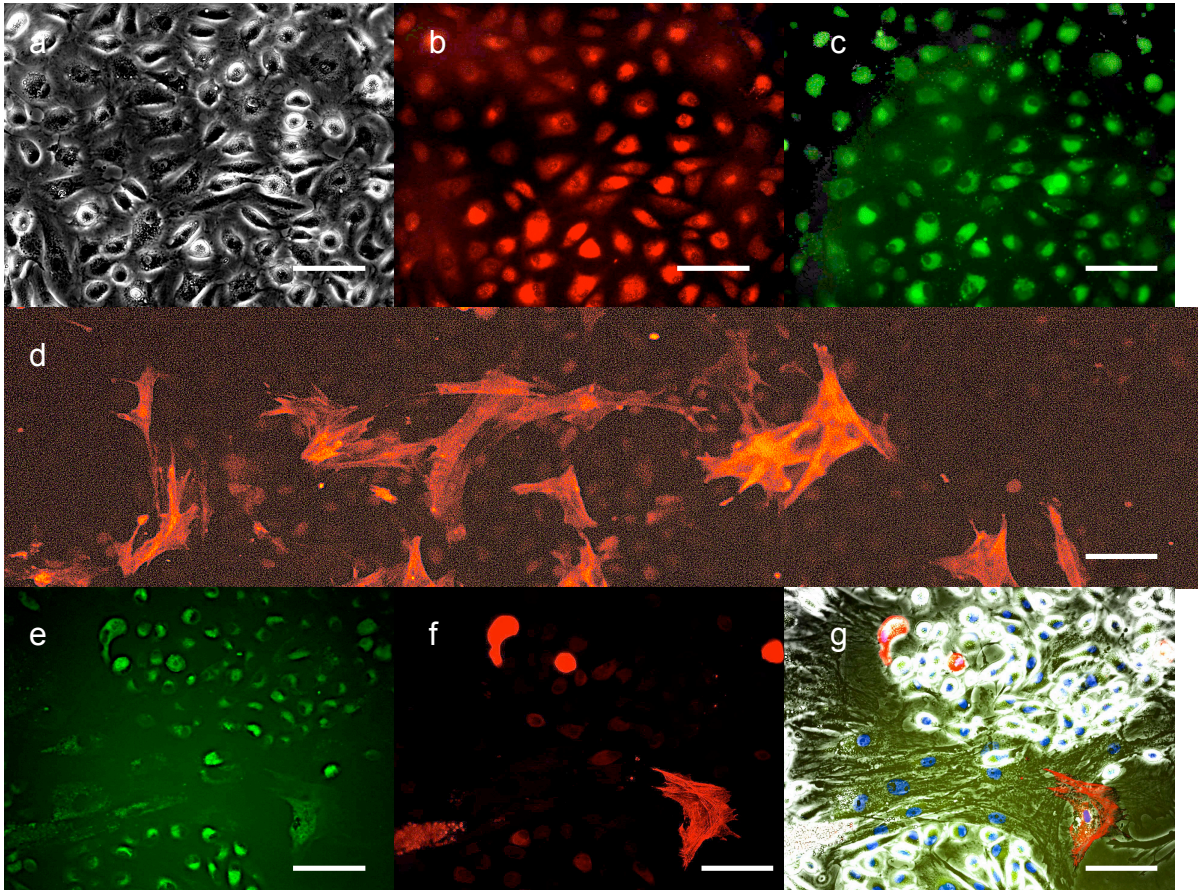


Abb. 20: Nachweis von Proteinen des kontraktile Apparates in Endothelzellen, Perizyten und glatten Muskelzellen venulärer Herkunft. a: Phasenkontrastbild einer reinen Endothelkultur, b: Nachweis von Desmin (Belichtungszeit 10 sec), c: Nachweis von Thrombomodulin; d: Nachweis von glattmuskulärem α -Aktin in Perizyten und schwach in begleitenden Endothelzellen (Belichtungszeit 7 sec); der Messbalken in a-d entspricht 250 μm . e: Verteilung von vWF in einer Mischkultur aus Endothelzellen (deutlich grün) und Perizyten bzw. glatten Muskelzellen (schwach grün). f: selektiver Nachweis von α -Aktin in den wenigen vorhandenen glatten Muskelzellen (kurze Belichtungszeit: 1 sec), g: Doppelbelichtung; der Messbalken in e-g entspricht jeweils 500 μm .

Venuläre Perizyten lassen sich gegenüber den Endothelzellen desselben vaskulären Ursprungs (identifizierbar z. B. durch CD141) ganz besonders deutlich abgrenzen, wenn sie immunologisch auf Gewebefaktor angefärbt werden (**Abb. 21 a – e**, Seite 45). Auch gegenüber glatten Muskelzellen erwies sich Gewebefaktor als hochspezifisches Antigen der Perizyten (nicht im Bild gezeigt). Ganz Analoges gilt auch für die Expression der Alkalischen Phosphatase, die ja bereits im Rahmen der oben besprochenen Reinigungsverfahren zur Charakterisierung und Abgrenzung der Perizyten als typisches Markerenzym dieser Zellen beschrieben wurde.

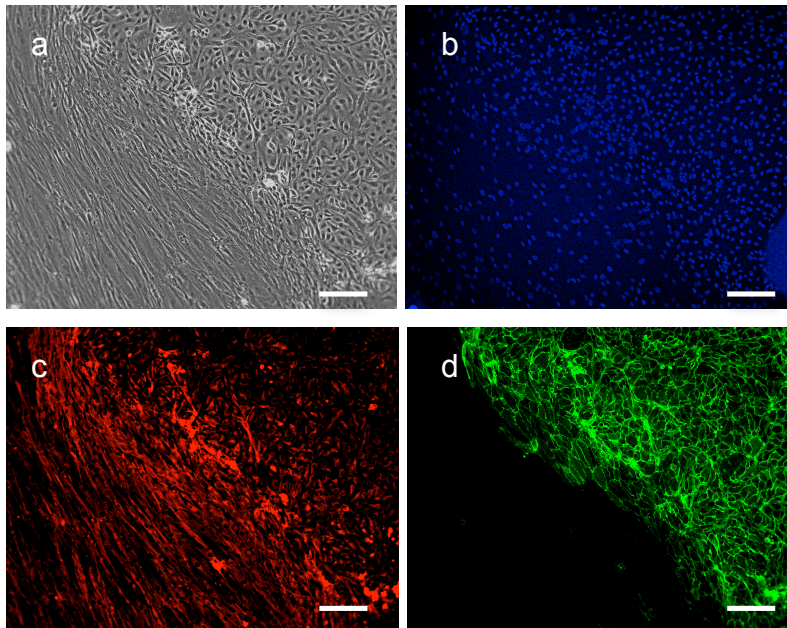
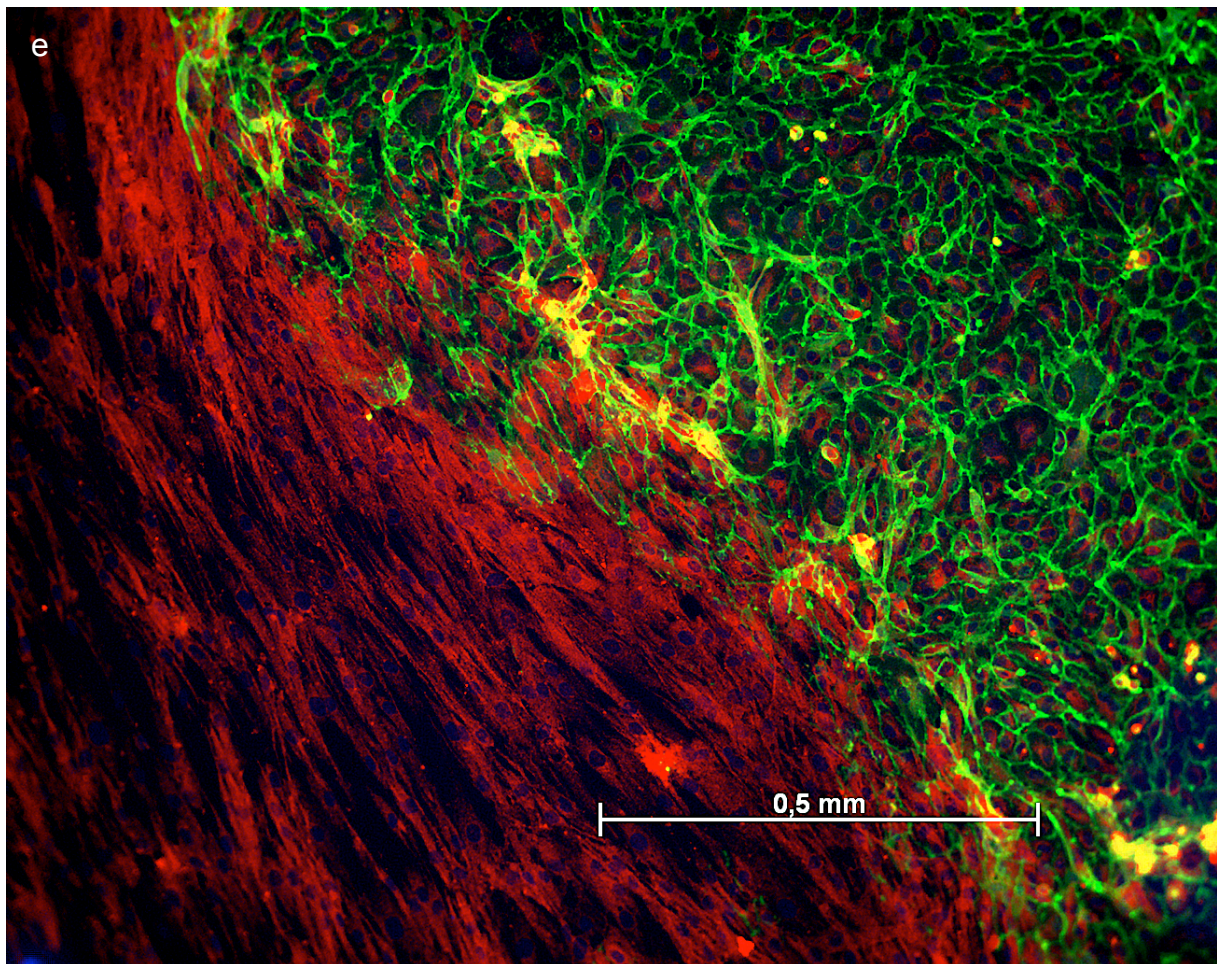


Abb. 21: Verteilung von Gewebefaktor (rot) und CD141 (grün) In einer Mischkultur aus Endothelzellen und Perizyten.
 a: Phasenkontrast,
 b: Anfärbung auf Kerne (DAPI),
 c: Anfärbung auf Gewebefaktor;
 d: Anfärbung auf CD141. Der Messbalken entspricht 500 μm . e: Dreifachbelichtung.



3.4.2. Untersuchung von Zellen arteriolären Ursprungs

Schon einige der im Rahmen der Beschreibung der verschiedenen Zellreinigungsmethoden gezeigten Phasenkontrastbilder (zum Beispiel **Abb. 14** oder **16**, Seite 38 bzw. 41) machen deutlich, dass Endothelgewebe arteriolären Ursprungs eine ganz andere Morphologie entwickelt als das entsprechende Gewebe venulären Ursprungs. Beide Spielarten des Endothels sind natürlich immer einschichtig angelegt. Während venuläres Endothel aber vor allem im Schräglicht durch eine beachtliche Dicke der Einzelzellen und deren typische „Pflastersteinmorphologie“ gekennzeichnet ist, handelt es sich bei arteriolärem Endothel um ein sehr dünnes und extrem flaches Gewebe, in dem die Einzelzellen stärker ausgebreitet vorliegen (siehe **Abb. 22**).

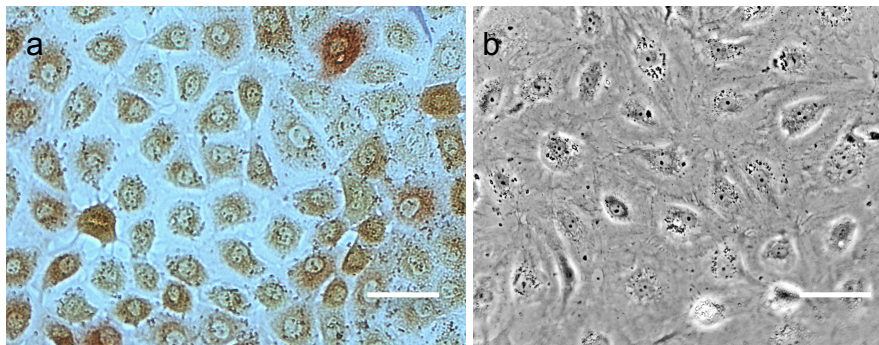


Abb. 22: Zellarchitektur und Morphologie von a: venulärem Endothel (nach Anfärbung auf DAP) und b: von arteriolärem Endothel. Phasenkontrastaufnahmen, der Messbalken entspricht jeweils 50 μm .

Es gibt weitere histologische Unterschiede, die erst deutlich werden, wenn man enzymhistochemische und immunologische Färbeverfahren zur Charakterisierung der Zellen anwendet. **Abbildung 23** (Seite 47) zeigt zweierlei: Zum einen fehlt den Endothelzellen arteriolären Ursprungs das für konfluente Endothelzellen venulären Ursprungs so charakteristische Markerenzym DAP IV, zum anderen exprimieren diese Zellen aber viel höhere Konzentrationen von vWF:Ag.

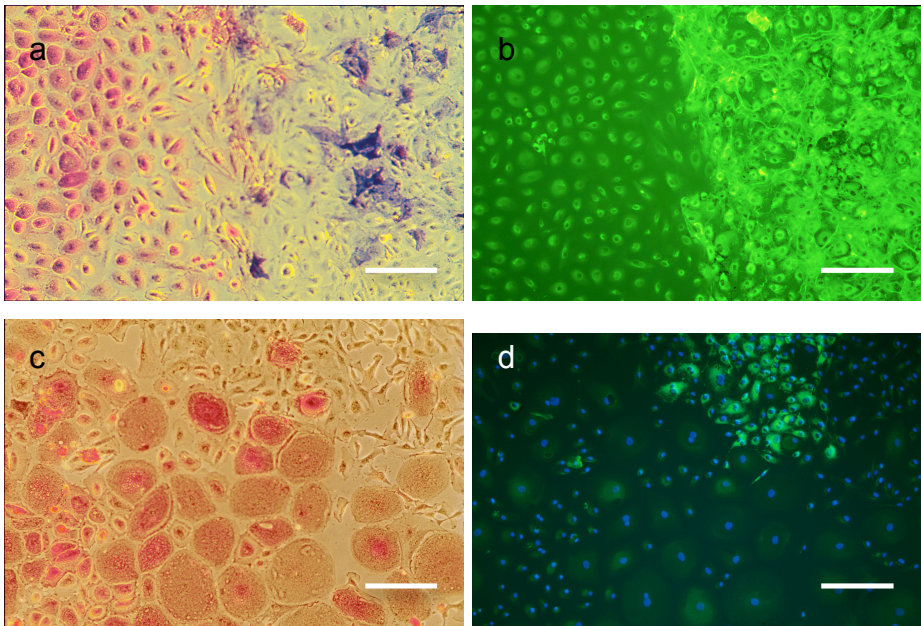


Abb. 23: *DAP IV (enzymhistochemischer Nachweis, roter Farbstoff) ist ein Markerenzym von Endothelzellen venulärer Herkunft, nicht aber von arteriolen Endothelzellen. Letztere besitzen aber viel höhere Konzentrationen an vWF:Ag als Endothelzellen venulärer Herkunft. a: Grenzbereich zwischen einer Endothelkolonie venulären Ursprungs (die Endothelzellen venulären Ursprungs in der linken Bildhälfte sind rot gegen DAP IV angefärbt), und einer arteriolen Ursprungs (rechte Bildhälfte, keine Expression von DAP IV durch die Endothelzellen); begleitende Perizyten imponieren aufgrund ihres charakteristischen Markers Alkalische Phosphatase blau. b: Anfärbung derselben Kulturen auf vWF:Ag. Die Bilder c und d machen dieselben Verhältnisse noch einmal bei stärkerer Vergrößerung deutlich. (Der Messbalken am unteren rechten Bildrand in a und b jeweils 125 μm , in c und d 500 μm).*

Ein weiterer Unterschied arteriöler Endothelzellen gegenüber venulären besteht darin, dass diese Endothelzellen die typischen Markerproteine des kontraktile Apparates von glatten Muskelzellen nicht enthalten. **Abbildung 24** macht dies am Beispiel des Desmins deutlich (24 c). Hingegen exprimieren auch die arteriölen Endothelzellen den typischen Marker CD141, also den wichtigen antikoagulatorisch wirkenden Rezeptor für Thrombin, das „Thrombomodulin“ (24 b).

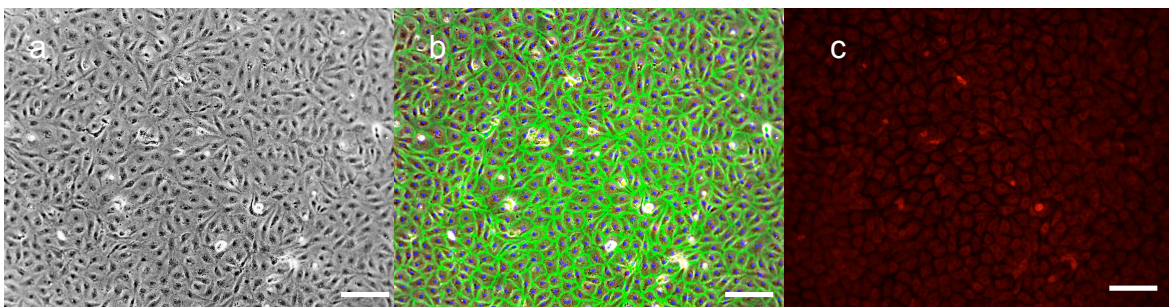


Abb. 24: *Endothelzellen arteriöler Herkunft exprimieren typischerweise Thrombomodulin, aber kein Desmin. a: Phasenkontrastaufnahme, b: Anfärbung auf CD141, c: Anfärbung auf Desmin (Belichtungszeit 10sec); der Messbalken jeweils in der rechten unteren Bildecke entspricht 250 μm .*

3.5. Gewinnung reiner Perizytenkulturen und Erprobung bzw. Weiterentwicklung von Verfahren zur Massenkultur von Perizyten mikrovaskulären Ursprungs aus dem bovinen Koronarsystem

3.5.1. Isolierung reiner Perizytenkulturen in größerem Ausmaß

Ausgangspunkt für die Züchtung von reinen Perizyten in größerem Ausmaß waren kreisflächige Mischkulturen venulären Ursprungs, in denen die zentral angeordneten Endothelkolonien durch die bereits beschriebene Schabetechnik (siehe 2.9.3.3., Seite 19) entfernt wurden. Selbst ein bei alten kreisflächigen Kulturen häufig zu beobachtendes Einwachsen von Perizytensträngen in den Bereich der zentralen Endothelkultur schadete nicht, da das komplette Zentrum der Kolonie entfernt und nur die äußere, aus Perizyten bestehende Randzone in der Schale belassen wurde. So konnten für diese Prozedur immer sechs statt vier (vergleiche analoge Technik für die Isolierung von Endothelzellen) Wochen alte Mischkulturen eingesetzt werden, die bereits einen dichten Perizytenrand entwickelt hatten. Somit ergaben sich pro Reinigungsprozedur schon alleine dadurch deutlich höhere Zellausbeuten. Auch bei großflächiger Wegnahme des Endothelgewebes betrug die Ausbeute ca. 70 000 Perizyten pro Kulturschale.

Bis zu siebenfach höhere Ausbeuten pro Schale erhält man sogar, wenn mit Hilfe einer speziell gefertigten Schablone in jede Schale mehrere Tropfen der initialen Zellsuspension aufgetragen werden. Hierbei ist auf gleichmäßigen Abstand der Auftragungspunkte zueinander und genügenden Abstand zum Rand zu achten. Sobald nämlich Zellen an diesem emporgewachsen sind, ist eine gründliche Trennung nicht mehr möglich. Es bewährte sich das in **Abb. 25** (Seite 49) dargestellte Auftragsschema für die einzelnen Startkolonien.

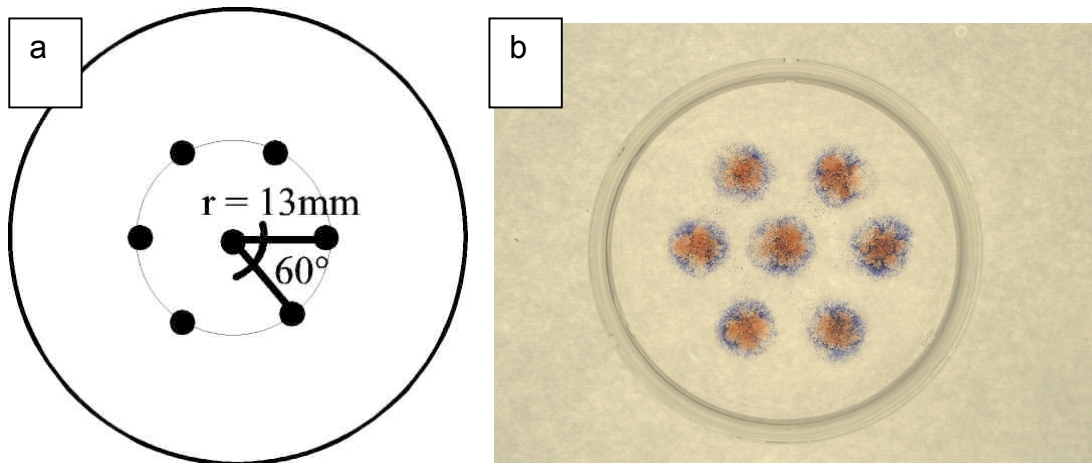


Abb. 25: Optimierte Auftragungsweise für Kreiskulturen aus Endothelzellen und Perizyten zum Zwecke der späteren Reinigung des Perizytensaumes durch Ausschaben der gebildeten zentralen Endothelkolonien. a: Schematische Darstellung einer speziell gefertigten Auftragsschablone für den Einsatz in Gewebekulturschalen mit einem Innendurchmesser von 60 mm. b: Enzymhistochemische Charakterisierung der Kulturen 2 Wochen nach Aussaat (Anfärbung auf DAP-IV und AP). Gut zu erkennen sind jeweils die zentral gebildeten Endothelkolonien (rot) mit ihrem Kranz aus blau gefärbten Perizyten, die sich im weiteren Verlauf noch deutlicher von den von ihnen eingekreisten, zentralen Endothelkolonien absetzen.

Im Gegensatz zu der bereits geschilderten, mit analoger Technik bewerkstelligten Reinigung von Endothelzellkolonien konnten bei der gerade beschriebenen Perizytenreinigung bereits nach einem Reinigungsschritt absolut reine Perizytenkulturen gewonnen werden. Bei der mikroskopischen Betrachtung (siehe **Abb. 26**) imponierten besonders bei hoher Vergrößerung vielfach verzweigte Zellfortsätze und die oft bizarre, sehr variable Form der Einzelzellen. Zudem fiel auf, dass nicht alle Zellen die routinemäßig enzymhistochemisch nachgewiesene AP (typisches Markerenzym) gleichmäßig stark exprimieren.

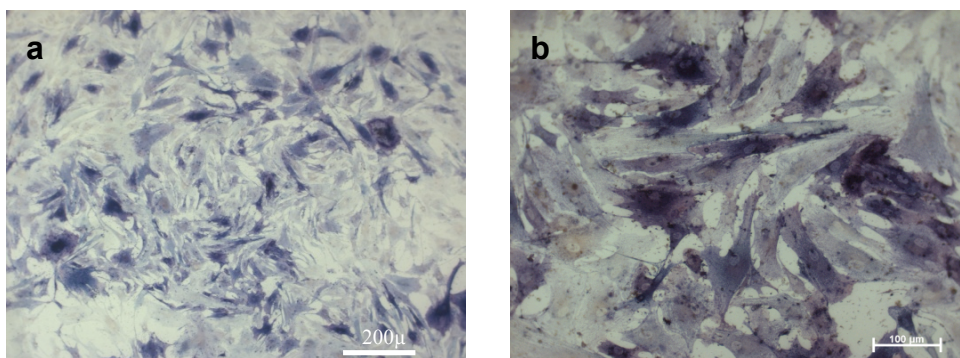


Abb. 26: Enzymhistochemisch erfasste Heterogenität der Expression von AP in gereinigten Perizytenkulturen. Hellfeldmikroskopie in zwei verschiedenen Vergrößerungen.

In gesonderten Experimenten konnte der Grund dafür herausgefunden und zudem ausgeschlossen werden, dass es sich bei den Zellen ohne AP-Expression um Fremdzellen handelt, die die Kulturen eventuell kontaminieren. Zu diesem Zweck wurde eine bei 37°C und Brutschrankatmosphäre auf einem Gewebekulturmikroskop proliferierende Perizytenkultur über einen Zeitraum von fünf Tagen in regelmäßigen Zweiminutenabständen photographiert. Danach wurde die Kultur fixiert und auf AP angefärbt. Anschließend wurde die Migration bestimmter Zellen über die Einzelbilder zurückverfolgt, und das Färbeverhalten der jeweiligen Ausgangszellen vor diesem Hintergrund eingeordnet (siehe **Abb. 27**).

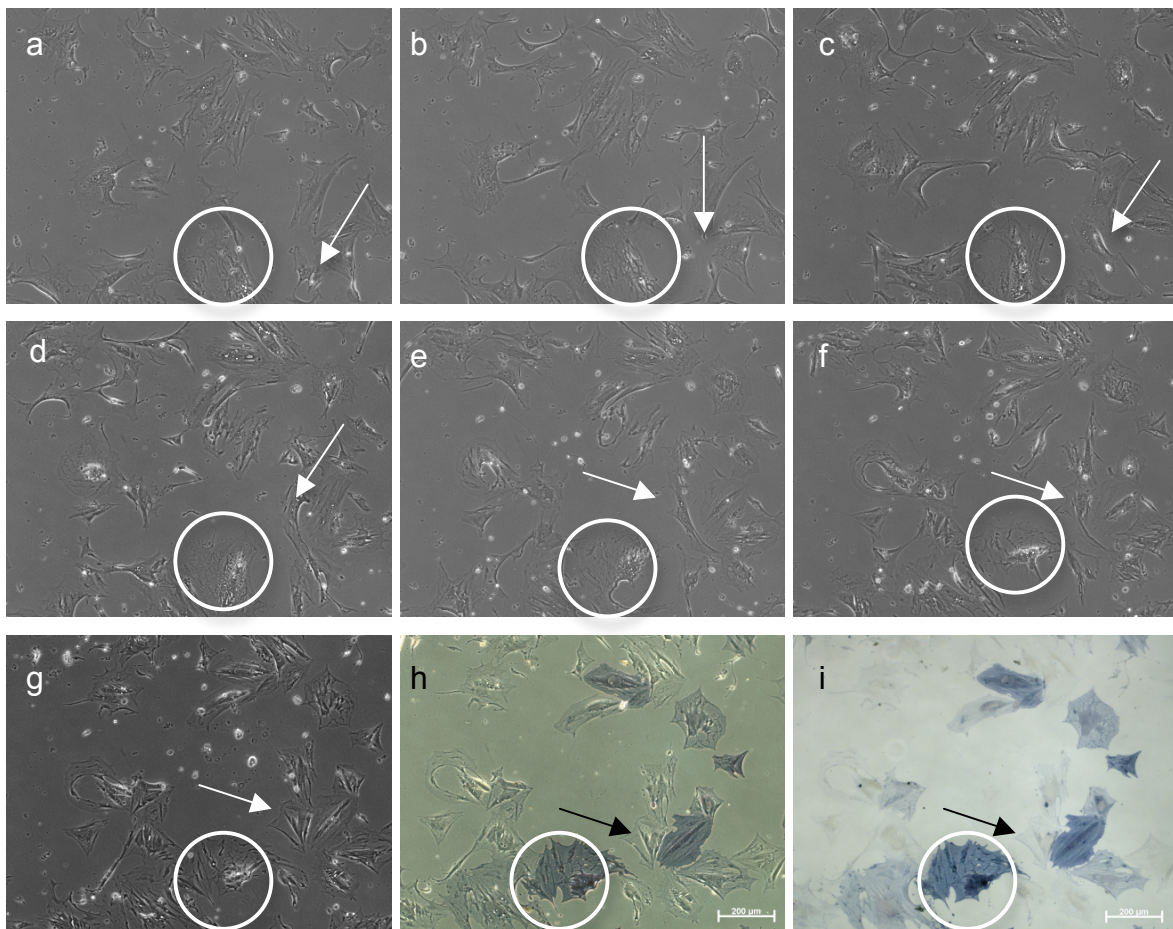


Abb. 27: Videokinematographische Untersuchung des Migrationsverhaltens und der AP-Expression proliferierender Perizyten. Beobachtung über 120 Stunden (Phasenkontrastaufnahmen bei 100 facher Vergrößerung): a: Ausgangsbild, b: nach 20h, c: nach 40h, d: nach 60h, e: nach 80h, f: nach 100h, g: nach 120h, h: nach 120h und Anfärbung auf AP (Phasenkontrast), i: nach 120h und Anfärbung auf AP (Hellfeld). Die in jedem Teilbild eingekreiste Zelle ist von Anfang an praktisch sessil und zeichnet sich durch eine hohe AP-Aktivität aus. Bei der jeweils mit Pfeil gekennzeichneten Zelle liegen die Verhältnisse umgekehrt.

Es zeigte sich in verschiedenen Experimenten, dass stets die sessilen Zellen eine stärkere AP-Aktivität entfalten als die migrierenden, das heißt, dass die Expression des Markerenzym also möglicherweise ein Ausdruck für eine bessere Verankerung

der Perizyten am Schalenboden ist. Solche Befunde sprechen dagegen, dass es sich bei den nicht angefärbten Zellen um Fremdzellen handelt. Vielmehr sind dies meist sehr junge Zellen, die sich kurz vorher geteilt haben und nach späterer Verankerung auch wieder hohe Aktivitäten an AP entfalten.

3.5.2. Massenkultur von Perizyten

Ein weiteres Ziel der Arbeit bestand darin, gereinigte Perizyten auch in noch größerer Menge zu kultivieren und schließlich zu ernten. Mittels kommerziell erhältlicher Mikroträger-Kügelchen (Mikrocarrier der Firma Pharmacia, Uppsala) und einer unter Leitung von Prof. Nees im Physiologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität entwickelten Spezialapparatur (spätere Fertigung durch E. Bühler, Tübingen, **Abb. 28**, Seite 52), konnten den Zellen große Oberflächen zum Wachstum zur Verfügung gestellt werden. Bereits 1,3 g der verwendeten Mikrobeads, einem Packungsvolumen von ca. 2ml entsprechend, besitzen eine Oberfläche von ca. 320 cm². In einem einzigen der jeweils verwendeten 100 ml-Zuchtkolben lassen sich leicht 6 ml dichtgepackte Mikrobeads mit einer Oberfläche von ca. 960 cm² suspendieren und damit Zellmengen kultivieren, für die man in üblichen Zellzüchtungsverfahren in Petrischalen ca. 100 Standardschalen (Durchmesser 35 mm) einsetzen müsste.

Im Laufe der zunehmenden Erfahrung mit der beschriebenen Apparatur bewährte sich das folgende Protokoll: In den ersten 24 Stunden nach der Aussaat werden sieben jeweils einminütige Suspensionsphasen eingeplant, jeweils gefolgt von vier Stunden Ruhe bei abgeschalteter Kolbenbewegung. Dieses Vorgehen lässt den ausgesäten Zellen genügend Zeit zur Anheftung auf den Mikrobeads und garantiert daneben aber auch eine gleichmäßige Verteilung des Inokulums auf alle Mikrocarrier.

Nach dieser Phase wird die Geschwindigkeit der Kolbenbewegung so reguliert, dass die Beads kontinuierlich in Suspension bleiben (gleichzeitiges Hin- und Herrotieren und Kippen der Kolben). Um eine ausreichende Nährstoffversorgung zu gewährleisten, werden zunächst alle zwei Tage 10% des Mediums durch frisches ersetzt. Im weiteren Verlauf kann eine höhere Austauschrate erforderlich sein.

Abb. 29 zeigt die Wachstumskurve von derart kultivierten Perizyten.



Abb. 28: Photographie der Vorrichtung zur Massenkultur von tierischen Zellen auf kontinuierlich suspendierten Mikroträgern in Betrieb. 1: Kolben mit suspendierten Mikroträgern (Temperierung auf 37°C, kontinuierliche, wechselseitige Halbdrehungen und Kippungen im Zellkultivationssystem von E. Bühler); 2: Begasungseinheit (5% CO₂ in wasserdampfgesättigter Luft im Gegenstrom zum umgepumpten, über vertikale Glasschlangen abfließenden Wachstumsmedium); 3: Mehrkanal-Rollerpumpe.

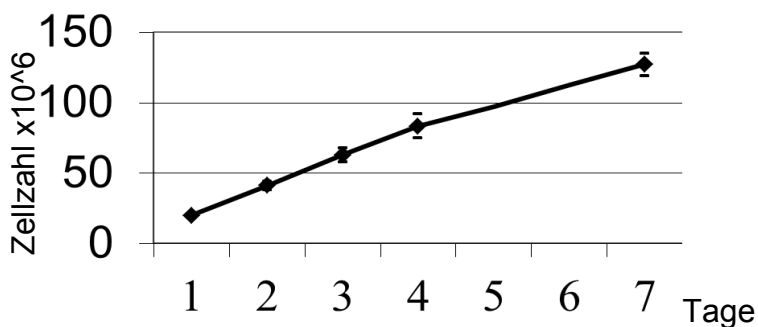


Abb. 29: Wachstumskurve bei der Kultur von Perizyten auf Mikroträgern (Mittelwert \pm SD, n=3). Der erste Tag markiert den Beginn der kontinuierlichen Suspension der inokulierten Mikroträger.

Als weiterer Ansatz zur Massenkultur von Perizyten eignet sich die Kultivation dieser Zellen innerhalb einer mit Mikroträgern gefüllten und mit Kulturmedium perfundierten Säule, wie sie im Prinzip auch für chromatographische Zwecke eingesetzt wird. Nur muss das gesamte Versuchsvorgehen natürlich unter vollkommen sterilen

Bedingungen und unter den üblichen zellkultivatorischen Rahmenbedingungen (37°C, Gaspartialdrücke wie im Brutschrank) durchgeführt werden.

Alle notwendigen apparativen Voraussetzungen inklusive der Spezialsäulen für dieses Verfahren wurden von der institutseigenen Werkstatt angefertigt. Die Säulen wurden in der zentralen Sterilisationseinheit des städtischen Klinikums München-Bogenhausen in übliche Sterilgutbeutel eingepackt und mit Ethylenoxid sterilisiert. Der anschließende Aufbau vier solcher Säulen unter aseptischen Bedingungen nahm ca. 1,5 Stunden in Anspruch. Die in **Abbildung 30** (Seite 54) gezeigte Versuchsanordnung bewährte sich in ausgiebigen, systematischen Testreihen am besten.

Mehrwöchige Versuche in enger Zusammenarbeit mit Prof. Nees zur Optimierung der Methodik mündeten schließlich in das folgende Protokoll: Nach Aufbau der Versuchsanordnung und Einsickern des Inokulums (ca. 1×10^5 Perizyten bzw. Zellen einer perizytenreichen Mischkultur) in einer ca. 1 cm breiten Startzone der Säulen werden diese in einen Wärmeschrank transferiert. Die optimale Perfusionsrate für das Kulturmedium beträgt initial ca. 5 ml/Tag/Säule. Nach 14 Tagen wird diese wöchentlich um 1 ml/Tag/Säule erhöht. Je nach Wachstum, welches gut am Ausmaß der Verfärbung des Mediums abzuschätzen ist (bei zu geringer Perfusionsrate anhäufende saure Stoffwechselprodukte verursachen einen Umschlag des üblichen pH-Indikators Methylrot in Gelb), kann vor allem in dicht bewachsenen Säulen eine größere Steigerung der Perfusionsrate erforderlich sein. Eine ausreichende und kontinuierliche Mediumzufuhr vorausgesetzt, dehnt sich die Wachstumszone nach 8 Wochen über eine Strecke von ca. 5 cm von der Auftragszone ausgehend nach unten in das Mikroträgerbett aus.

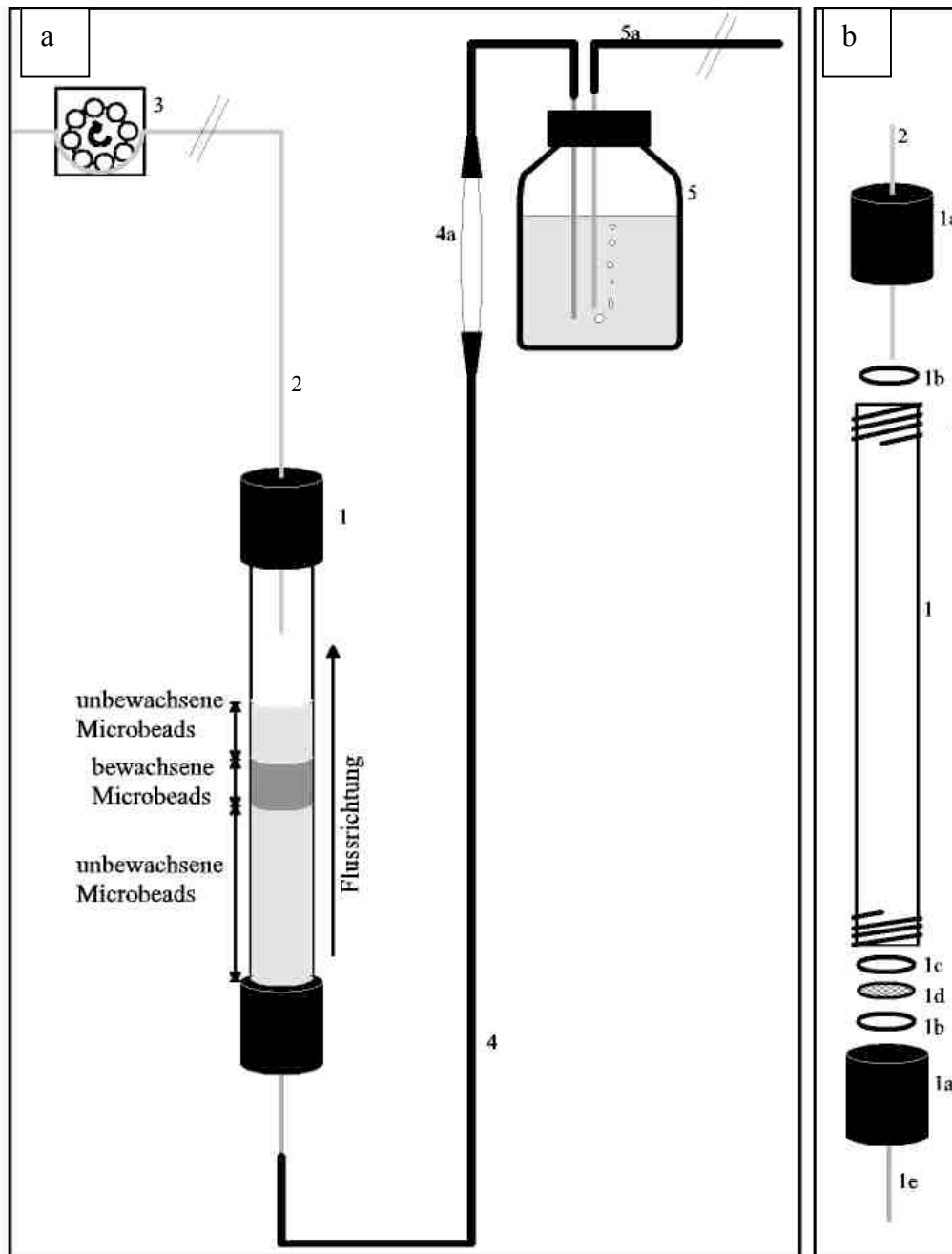


Abb. 30: Säulenapparatur zur Perizytenreinigung und -massenkultivierung:
 a: Übersichtsschema des Versuchsaufbaues, 1: befüllte Säule, 2: ableitender Schlauch, 3: Rollerpumpe, 4: zuführender Schlauch mit 4a: Blasenfänger, 5: Vorratsgefäß mit 5a: Gaszuleitung; b: Konstruktionselemente der Säule: 1: Plexiglasrohr mit 1a: Deckel, 1b: Dichtung, 1c: Beilegscheibe, 1d: 50 µm Netz, 1e: Stahlkanüle, 2: ableitender Schlauch.

Nach dieser Zeit wurden in unseren Pilotexperimenten die Säulen geöffnet und die Füllung vorsichtig aus dem Plexiglasmantel herausgedrückt. Das Säulenbett wurde in 1 cm breite Kompartimente zerteilt, deren Zellen wurden proteolytisch abgelöst und in Petrischalenkulturen überführt. Abgesehen von der Auftragszone, die noch geringe Beimengungen an Endothelzellen aufwies, handelte es sich bei allen aus darunter liegenden Säulenschichten geernteten Perizyten um absolut homogene

Zellpräparate (siehe **Abb. 31**). Es ergaben sich Zellausbeuten von $8 \times 10^6 \pm 0,9$ (n=4) Zellen pro Säule. Das Verfahren eignet sich deshalb nicht nur zur Massenkultur, sondern auch für eine nochmalige Reinigung initial verfügbarer Perizytenpräparate sehr gut. In der weiteren routinemäßigen Anwendung kann zudem (wie auch im Methodikteil 2.9.5.2., Seite 23 beschrieben) auf das aufwendige Zerteilen des Säulenbettes in 1 cm breite Kompartimente verzichtet werden. Es muss lediglich die Auftragungszone mit einem Sicherheitsabstand verworfen werden, die restlichen Bestandteile können gemeinsam aufgearbeitet werden.

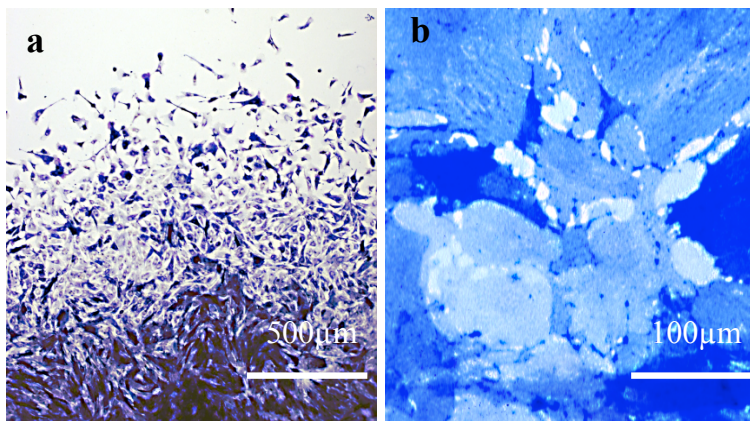


Abb. 31: Reine Perizytenkulturen nach Anfärbung auf AP. a: Übersichtsbild, b: Vergrößerung.

4. Diskussion

4.1. Proteolytische Desintegration von Myokard und Gewinnung angereicherter Zellsuspensionen

In der vorliegenden Arbeit wurden - von proteolytisch dissoziiertem und suspendiertem Myokardgewebe ausgehend – die segmentspezifischen venulären Endothelzellen und die Perizyten bevorzugt aus dem Koronarsystem des Rinderherzens gewonnen. Für das Herz als Ausgangsgewebe sprechen seine besonders gute Durchblutung und das dementsprechend reich entfaltete Mikrozirkulationssystem. Aus diesem lassen sich große Mengen Endothelzellen und Perizyten isolieren^{18,30}. So befinden sich zum Beispiel im Myokard der Ratte 9×10^7 Endothelzellen³¹ und $3,6 \times 10^7$ Perizyten pro cm^3 . Beide Zellarten sind damit häufiger vorhanden als Kardiomyozyten ($2,7 \times 10^7/\text{cm}^3$)³¹. Dennoch bilden letztere 84% des Myokardvolumens. Das Herauslösen der Endothelzellen und Perizyten aus dem Gewebeverband und Abtrennen von kontaminierenden Fremdzellen ließ sich daher nur durch einen komplexen Separationsprozess bewerkstelligen.

Das Rindersystem bietet sich aufgrund der ausgeprägten Abhängigkeit der Proliferation von mikrovaskulären Zellarten von bestimmten Wachstumsfaktoren an. Dieses Phänomen fand bisher in der Literatur nur wenig Berücksichtigung. Wie der Arbeitskreis um Prof. Nees aber unter Einschluss von Erkenntnissen der vorliegenden Untersuchung zeigen konnte^{18,30}, lassen sich Gefäßwandzellen mikrovaskulären Ursprungs jedoch besonders gut in Nährmedien mit Zusatz des jeweiligen spezie-spezifischen fetalen Serums züchten. Da fetales bovines Serum routinemäßig und relativ kostengünstig bezogen werden kann, wurde das Rinderherz das bevorzugte Ausgangsorgan für alle weiterführenden Untersuchungen der vorliegenden Arbeit.

In der Literatur wird die Gewinnung von mikrovaskulären Zellarten aus unterschiedlichsten menschlichen und tierischen Geweben beschrieben. Trotz der Vielfältigkeit der verwendeten Spezies- und Gewebearten gingen die meisten dieser Verfahren (zum Beispiel³²⁻³⁷) dabei von einem prinzipiell ähnlich aufgebauten, zweiteiligen Präparationsansatz aus: Das Ausgangsgewebe wurde zunächst rein mechanisch, zum Beispiel mit einem Skalpell, in kleine Stücke zerlegt und anschließend in einer Proteaselösung inkubiert. Dabei war aber keine homogene

Verteilung der zur Gewebedissoziation eingesetzten Proteasen gewährleistet. In der vorliegenden Untersuchung wird hingegen mit den optimierten Perfusionssystemen ein vollkommen anderer Ansatz verfolgt. Die Enzymperfusion ermöglicht dabei eine homogene Verteilung der Proteasen und schafft damit die Voraussetzung für ein gleichmäßiges, kontrolliertes Einwirken der jeweils eingesetzten Kollagenase/Dispase-Gemische. Dabei erwiesen sich auch deren spezifische Zusammensetzung und Qualität als entscheidend für den Erfolg der Myokarddissoziation. Als unerwartetes Problem hatte sich nämlich zu Beginn der Versuchsreihen gezeigt, dass einige kommerziell erhältliche Proteasen je nach verwendeter Charge stark schwankende Enzymaktivität besitzen können. Erst durch den Einsatz von Proteasen mit standardisierter und streng kontrollierter Enzymaktivität konnten für die jeweilige Spezies optimierte Enzymgemische entwickelt und für weitere Versuche sicher reproduziert werden.

Für die weitere Dissoziation des Myokardgewebes erwies sich die routinemäßig durchgeführte Nachverdauung in einem pipettenartigen Steigrohr als besonders wertvoll. Eine vergleichbare Methode, die eine enzymatische Dissoziation mit einer schonenden mechanischen Komponente kombiniert, wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Durch die Steigrohrapparatur lässt sich der Dissoziationsgrad so gut steuern, dass je nach Einwirkdauer entweder Einzelzellen oder auch vollständige Gefäßnetze isoliert werden können. Letzteres wurde in der Arbeitsgruppe um Prof. Nees bereits erfolgreich umgesetzt und führte zu weiteren interessanten Erkenntnissen, die Gegenstand mehrerer aktueller Publikationen sind^{18,30,38}.

Es lässt sich also festhalten, dass die Methoden der Enzymzirkumfusion und der enzymatisch/mechanischen Dissoziation im Steigrohr zwar präparativ und apparativ hochkomplexe und aufwendige Verfahren sind, aber nur durch sie hinreichend dispergierte Gewebepreparate als Ausgangspunkt für die weitere Aufarbeitung und Gewinnung angereicherter Endothelzell- und Perizyten suspensionen bereitgestellt werden können.

Zur Reinigung von Mikrogefäßnetzen, Endothelzellen und Kardiomyozyten aus solchen Suspensionen verwendeten meine Kollegen A. Dendorfer²⁸, G. M. Juchem²⁹, M. Thalmeier³⁹, B. Heilmeyer⁴⁰ und D. R. Weiss¹¹ diskontinuierliche Percollgradienten, die sie mit Hilfe von Gradientenmischern bereiteten. Besonders elegant ließen sich die prinzipiellen Vorteile dieser Trenntechnik der Dichtegradientensedimentation mit Hilfe einer speziellen, durch Prof. Nees

entwickelten Zellseparationszentrifuge realisieren. Die damit erzielbare Trennschärfe ist sehr groß¹⁸, der präparative Aufwand aber ebenfalls. Vor diesem Hintergrund stellen die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen, stark vereinfachten Isolierungsprotokolle eine methodische Erleichterung dar, vor allem wenn es um die Etablierung größerer Mengen von Zellkulturen mikrovaskulären Ursprungs aus dem Koronarsystem geht. Für deren erfolgreiche Etablierung in Reinkulturen ist es nämlich entscheidend, dass bereits die Primärkulturen mit stark angereicherten Inokula angelegt werden.

4.2. Isolierung von mikrovaskulären Endothelzellen venulären Ursprungs

Soweit mir die Literatur zugänglich war, wurde bisher noch nie zweifelsfrei die Etablierung von Endothelzellen aus definierten Segmenten von Mikrozirkulationssystemen beschrieben. In den zwei dennoch entdeckten Arbeiten zur Isolierung venulärer Endothelzellen^{41,42} fehlen jedenfalls genaue Angaben zur Reinheit der Kulturen und der Beweis für den proklamierten Gefäßursprung.

Dagegen gibt es mehrere Arbeiten mit dem Anspruch der Isolierung von „Endothelzellen mikrovaskulären Ursprungs“ (ohne Versuch der Unterscheidung ihrer arteriolären, kapillären, oder venulären Herkunft). So wurde in der Literatur die Isolierung solcher Zellpräparate aus Gehirn⁴³, Lunge^{33,43}, Retina⁴⁴, Haut⁴⁵ oder Herz^{32,41,42,46} berichtet. Zur Gewinnung von mikrovaskulären Endothelkulturen menschlichen Ursprungs wurden Explantatherzen⁴⁶, Fettgewebe⁴⁷, Vorhaut⁴⁸ und Placenta⁴⁹ eingesetzt. In diesen Berichten finden sich meist jedoch nur vage („pure“)^{43,50} Angaben zur Reinheit der gewonnenen Zellkulturen. Lediglich Gupta et al.⁴⁸ geben eine Kontamination ihrer Präparate mit 1-3% Fremdzellen an. Die quantitative Zellausbeute wird nicht genannt.

Bei dem Versuch der segmentspezifischen Isolierung von mikrovaskulären Endothelzellen im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestand ein zunächst nicht erwartetes, aber gut reproduzierbares Ergebnis darin, dass sich die Endothelzellen venulären Ursprungs schon in großer Reinheit aus der zur Organdesintegration eingesetzten Proteaselösung isolieren lassen¹⁸. Die so angereicherten Zellkulturen dienen als Ausgangsbasis für die verschiedenen beschriebenen Verfahren zur Isolierung von Reinkulturen. In systematischen Versuchreihen wurden diese

Techniken erprobt und etabliert, sie erwiesen sich als äußerst effizient, reproduzierbar und kostengünstig. Beim Vergleich wurde aber deutlich, dass die mechanische Reinigung kreisförmig angelegter Kulturen unter Einsatz einer Ausschabetechnik mit ihrem hohen zeitlichen Aufwand bei nur geringer Ausbeute (10.000 Zellen pro 60 mm Schale) nicht als Methode der ersten Wahl anzusehen ist. Zudem ist diese Methodik anfällig für Kontamination der Zellkulturen durch Bakterien, Viren oder Pilze und stark von subjektiver Erfahrung und peniblen Arbeiten abhängig.

Dagegen erwiesen sich die Reinigungsverfahren mittels Dispase II- oder Protaminchlorid-Inkubation als gut reproduzierbar und auch technisch einfach durchführbar. Mit ihrem Einsatz konnten große Mengen (750.000 Zellen pro 60mm Schale) absolut reiner (100%) Endothelzellkulturen venulärer Herkunft gewonnen werden. Bei Einhalten der aseptischen Standards der Gewebekultur bestand kein wesentlich erhöhtes Kontaminationsrisiko.

Im Hinblick auf den erfolgreichen Einsatz von Dispase II zur Nachreinigung von Endothelkolonien ist offenbar davon auszugehen, dass die flächigen und dichten Endothelkulturen ihre Anheftung an den Boden quasi selbst vor der Proteasewirkung abschirmen. Außerdem kommt die Adhäsion der Endothelzellen an dem stark positiv geladenen Schalenboden der Zuchtgefäße wohl auch hochgradig allein schon durch elektrische Anziehungskräfte zustande. Im Gegensatz zu Perizyten synthetisieren Endothelzellen jedenfalls nur wenig extrazelluläre Matrix (ECM), die durch Proteasen rasch abgebaut werden kann. ECM wird in der Gefäßwand vor allem durch die Perizyten aufgebaut und dient unter anderem der Verankerung^{18,30}. So wird erklärlich, dass gerade kontaminierende Perizyten besonders leicht proteolytisch abgelöst und aus Mischkulturen weggespült werden können.

Weniger klar erscheint die Wirkungsweise des Protaminchlorids. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass Protamin den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) inhibieren und dessen Rezeptorbindung verhindern kann⁵¹. In unseren Beobachtungen waren aber gerade Perizyten in ihrem Wachstum und ihrer Zellintegrität stark von Wachstumsfaktoren abhängig. So könnten diese im Gegensatz zu den Endothelzellen während der Inkubation soweit beeinträchtigt worden sein, dass sie der anschließenden mechanischen Reinigung (Spülen mit scharfem Strahl) gegenüber nicht mehr ausreichend widerstandsfähig waren und abgelöst wurden.

In Hinblick auf erzielbare Reinheit und Zellausbeute sind beide Ablöseverfahren vergleichbar.

Von den bisher in der Literatur eingesetzten Methoden zur Reinigung von Endothelzellen aus rohen Zellpräparaten werden für die Durchflusszytometrie^{32,43,46,50} die besten Trennresultate beschrieben. Von Craig et al.⁴³ wurde dieses Verfahren sogar als die einzige Möglichkeit zur Reinigung von Endothelzellen angesehen. Diese Methodik setzt allerdings ein besonders teures technisches Gerät und eingearbeitete Techniker voraus, erzielt im Hinblick auf diesen enormen Aufwand aber nur eine geringe Ausbeute an Endothelzellen. Außerdem geht das Verfahren vom Vorliegen absolut homogen suspendierte Zellpräparate aus, das sich unserer Erfahrung nach im Hinblick auf Zellpräparate aus Gefäßwänden wegen ihrer Neigung zur Bildung fester Mikroaggregate aber nie realisieren lässt.

Ein anderer Ansatz zur Endothelzellisolierung wurde von Kalpna Gupta et al.⁴⁸ verfolgt. Dieser beruht auf EN4-bedeckten Zellkulturschalen, die nur Endothelzellen die dauerhafte Anheftung erlauben sollen. Aufgrund der hohen Kosten für den speziellen Antikörper erschien dieses Vorgehen allerdings zur massenhaften Isolierung von Endothelzellen kaum geeignet.

4.3. Isolierung von mikrovaskulären Endothelzellen arteriolären Ursprungs

Die systematische Untersuchung arterieller Endothelzellen begann wie bereits erwähnt 1973 mit deren Isolierung aus menschlichen Nabelschnüren²², die bekanntlich arterielles Blut führen. Nach und nach wurden Verfahren zur Gewinnung von Endothelzellen aus verschiedensten tierischen und menschlichen arteriellen Makrogefäßen beschrieben⁵²⁻⁵⁸. Aus dem mikroarteriellen (arteriolären) Bereichen des Gefäßsystem finden sich in der Literatur hingegen kaum Berichte über eine erfolgreiche Etablierung der betreffenden Endothelzellen. Lediglich Diglio et al. beschrieben eine entsprechende Methode^{59,60}. Homogenisiertes Hirngewebe wurde hierbei durch ein 150 µm Sieb filtriert, auf dem Netz blieben mikrovaskuläre Gefäße zurück, die aufgrund licht- und elektronenmikroskopischer Untersuchungen hauptsächlich arteriolären Ursprungs gewesen sein sollen. Vor dem Hintergrund der heutigen histologischen Identifizierbarkeit solcher Gefäße (siehe 3.4.2., Seite 46) erscheint diese Beweisführung aber als wenig überzeugend. Die Isolierung der

betreffenden arteriolären Endothelzellen erfolgte über den mehrfachen Einsatz von Klonierungsringen bis zum Vorliegen von Reinkulturen.

Bei dem in der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ansatz wurde zunächst eine starke Anreicherung der arteriolären Zellen in der **Myokardfraktion 1** durch Dichtezentrifugation erzielt. Durch den in systematischen Versuchsreihen entwickelten, abgestuften Einsatz verschiedener Zellkulturmedien konnten sodann Wachstumsbedingungen geschaffen werden, die ausschließlich die arteriolären Endothelzellen favorisierten, so dass Begleitzellen mit der Zeit fast vollständig verdrängt wurden. Vergleicht man die beiden eingesetzten Wachstumsmedien mit dem Standardmedium DMEM, so lässt sich ein deutlicher Unterschied im Gehalt an Protein und an Wachstumsfaktoren konstatieren, der wohl für das selektive Wachstum arteriolärer Endothelzellen verantwortlich zu machen ist. Da es sich hierbei um einen verdrängenden Prozess handelt, war die erforderliche Kultivationszeit relativ lang und lag bei 16 Wochen. Nach dieser Zeit ergab sich ein Reinheitsgrad von 98%.

Die eindeutige Identifikation der arteriolären Endothelzellen erfolgte über morphologische, immunologische und enzymhistochemische Kriterien (siehe 4.3.2., Seite 46), die mittlerweile auch ihren Niederschlag in drei aktuellen Publikationen der Arbeitsgruppe Prof. Nees fanden^{18,30,38}.

4.4. Isolierung von Perizyten

Ziel der vorliegenden Arbeit war es unter anderem, kardiale Perizyten unterschiedlicher Spezies regelhaft zu isolieren und bovine Perizyten in großen Mengen zu züchten. Dabei konnte bereits auf große Erfahrungen der Arbeitsgruppe um Prof. Nees zurückgegriffen werden. So hatten systematische Untersuchungen ergeben, dass Perizyten im Myokard in großer Anzahl vorkommen und sogar dessen zweithäufigster Zelltyp sind^{18,30,38}. In diese Arbeiten flossen auch Erkenntnisse der vorliegenden Untersuchung ein.

Die effektive und sicher reproduzierbare Perizytenisolierung gelang jedoch erst nach Optimierung von bestehenden Dissoziationsverfahren im Hinblick auf die verwendete Präparationstechnik, Apparatur und eingesetzten Proteaselösung³⁰ (siehe 3.1., Seite 26). Zudem waren einige methodische Neuentwicklungen wie die Säulenzuchtmethode erforderlich.

In der Literatur gibt es viele Berichte über Gewinnung von Perizyten aus unterschiedlichsten Ausgangsgeweben wie Skelettmuskel⁶¹, Gehirn^{62,63}, Leber⁶⁴, Lunge⁶⁵, Pankreas⁶⁶ und Niere⁶⁷, ein Großteil der Forschung konzentriert sich auf retinale Perizyten⁶⁸⁻⁷². Wie schon bei den mikrovaskulären Endothelzellen greift man dabei zur Gewinnung menschlicher Perizyten wohl aufgrund der relativ einfachen Verfügbarkeit oft auf Plazenta^{73,74} oder Vorhaut³⁷ zurück. Die Isolierung humaner kardialer Perizyten ist bisher überhaupt nicht, die von tierischen kardialen Perizyten nur für Rattenherzen³⁵ beschrieben. Für die meisten der oben genannten Ausgangsgewebe menschlichen oder tierischen Ursprungs wurden Methoden beschrieben, die aus einer Kombination von mechanischer Zerkleinerung und anschließender Inkubation der Gewebestücke in Proteaselösung bestanden. So wurde zum Beispiel die Ventrikelspitze mit dem Skalpell zerkleinert, zunächst in Trypsin und dann in einer Collagenase/Desoxyribonuclease inkubiert³⁵. Eine Enzymperfusion wurde nicht durchgeführt, obwohl diese gerade bei den kleinen Herzen eine komplette Dissoziation ermöglichen würde und so für eine relativ hohe Ausbeute sorgen könnte. Dies müsste sich umso stärker auswirken, da die Autoren mit jungen Ratten (ca. 125 g) arbeiteten. Aus älteren Ratten (ca. 250 g) gelang es ihnen nicht mehr, Endothelzellen oder Perizyten zu isolieren. In der vorliegenden Arbeit hingegen konnten Ratten bzw. Meerschweinchen mit einem Körpergewicht von gut 300 g problemlos verwendet und beide Zelltypen gewonnen werden.

Die Selektion der Perizyten aus Rattenmyokard erfolgte bei He et al.³⁵ über deren fehlenden Dil-acLDL-Aufnahme. In entsprechend behandelten Zellkulturen wurden die Bereiche ohne acLDL-Aufnahme (also Perizytenkolonien) markiert und alle anderen anschließend mechanisch entfernt. Bei der Reinigung kam also ebenfalls eine manuelle Entfernung von Fremdzellen zum Einsatz (vergleiche mechanische Reinigung von Perizyten aus speziell angelegten kreisförmigen Kulturen). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass mit etwas Erfahrung eine mechanische Reinigung allein aufgrund der Morphologie ohne weitere Markierung sicher möglich ist, wenn die Zellkulturen hierfür speziell kreisförmig angelegt sind. Da die Zellausbeute mit ca. 7×10^4 Zellen pro 60 mm Schale jedoch relativ gering war, erschien diese Methode für die Massenkultur nicht geeignet. Zu diesem Zweck wurde ein völlig neuartiges Verfahren („Säulenzuchtmethode“) entwickelt, das auf den zuvor beobachteten Wachstumseigenschaften beruhte. In der speziellen Säulenapparatur waren nur die Perizyten in der Lage über größere Strecken zu migrieren und sich so

von den ortsständigen Endothelzellen abzusetzen. Diese Isolierungstechnik war zwar enorm aufwendig, lieferte dafür aber eine große Menge (ca. 8×10^6 Zellen pro Säule) absolut reiner Perizyten und damit den Grundstock für weiterführende Untersuchungen. Eine vergleichbare Methode wird in der mir zur Verfügung stehenden Literatur bisher nicht beschrieben.

4.5. Identifizierung der kultivierten Endothelzellen und Perizyten

Die Identifizierung der Endothelzellen arteriolären und venulären Ursprungs gelang durch Nachweis allgemein für vaskuläres Endothel akzeptierter Marker wie vWF:Ag⁷⁵⁻⁷⁸, CD 141 (Thrombomodulin)^{79,80} und PECAM (CD 31)^{76,79,81-84}, sowie durch ihre endotheltypische Gewebearchitektur („Pflastersteinmorphologie“^{45,78,85}). Im Gegensatz zu Endothelzellen arteriolären Ursprungs besaßen die venulären Ursprungs auch Dipeptidylaminopeptidase IV. Außerdem ließen sich speziell in diesem Endotheltyp typische Proteine des glattmuskulären kontraktiven Apparates in deutlicher Konzentration nachweisen, die allerdings um den Faktor 15 niedriger lag als in glatten Muskelzellen der Gefäßwand. Diese Untersuchungen sind in eine kürzlich publizierte Untersuchung der Arbeitsgruppe um Prof. Nees eingeflossen und werden dort ausführlicher diskutiert¹⁸.

Perizyten wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch ihren Gehalt an Alkalischer Phosphatase¹¹ und ihre bizarre, durch geweihähnliche Ausläufer charakterisierte Morphologie^{14,86} identifiziert. Andere (in der vorliegenden Arbeit nicht routinemäßig herangezogene) Marker betreffen die Expression von tissue factor^{7,87}, glattmuskulärem α -Aktin^{8,88-90}, Desmin⁹⁰⁻⁹², NG2^{61,73,89} und PDGFR β ^{61,93,94}. Außerdem konnte gezeigt werden, dass diese Zellen zur Phagozytose befähigt sind und den Rezeptor zur Inkorporation von acLDL besitzen. Entsprechende Untersuchungen, in die auch Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit einfließen, wurden kürzlich publiziert und ausführlich diskutiert³⁰.

4.6. Massenkultur auf Mikrocarriern

Die Verwendung von Mikrocarriern zur Kultur humaner diploider Zellen wurde erstmals 1967 durch van Wenzel⁹⁵ beschrieben und hat sich seitdem zu einem etablierten Kulturverfahren für eine Vielzahl unterschiedlicher menschlicher und tierischer Zellarten^{96,97} entwickelt. In den letzten Jahren rückte dieses Verfahren insbesondere in der regenerativen Medizin erneut in den Fokus, um z. B. Knorpel- oder Stammzellen in großen Mengen zu züchten^{97,98}. Als Vorteile wurden unter anderem die Verlässlichkeit und die geringen Kosten angesehen. Besonders interessant erschien auch, dass durch einfache Zugabe von weiteren Mikrocarriern die Wachstumsoberfläche und damit potentiell auch die Zellausbeute nahezu beliebig erweiterbar ist^{97,98}. Zudem können Subkulturen durch einfaches Übertragen von bewachsenen Mikrocarriern in entsprechende Kulturgefäße mit unbewachsenen Mikrocarriern etabliert werden. Ein enzymatisches Ablösen der Zellen ist hierzu nicht erforderlich⁹⁷. Da für weiterführende Untersuchungen an Perizyten, wie zum Beispiel die Isolierung spezifischer Antigene, große Zellmengen erforderlich ist, war nach deren Isolierung eine Massenkultivierung der nächste erforderliche Schritt. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass auch Perizyten in großen Mengen auf Mikrocarriern erfolgreich gezüchtet werden konnten.

Im Methodikteil (2.9.5.1., Seite 21) wurde deutlich, dass es sich bei dem beschriebenen Verfahren um eine komplexe, sehr aufwendige und materialintensive Form der Zellkultur handelte. Bei dem enormen erreichbaren Flächenangebot war dafür eine Steigerung Zellzahl nach 7 Tagen um den Faktor 6 möglich. Perizyten blieben also in der Mikrocarrier-Kultur uneingeschränkt überlebens- und teilungsfähig, so dass sich dieses Verfahren für eine massenhafte Züchtung anbietet. Die erreichbaren Teilungsraten lagen allerdings niedriger, als die in der Literatur für andere Zellarten beschriebenen^{96,97}.

5. Zusammenfassung

Das übergreifende Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Endothelzellen und Perizyten aus Arteriolen und Venulen des koronaren Mikrogefäßsystems zu isolieren und in jeweils homogenen Zellkulturen zu etablieren. Vorhandene Methoden zur proteolytischen Desintegration von Myokardgewebe wurden überarbeitet und im Hinblick auf Reproduzierbarkeit und Effektivität optimiert. In aufwendigen Versuchreihen ist es gelungen, sowohl für Klein- als auch für Großtierherzen (in weiteren Versuchen sogar für menschliche Herzen) standardisierte Apparaturen, Proteaselösungen und Versuchsprotokolle zu entwickeln, die nun eine routinemäßige und reproduzierbare enzymatische Dissoziation von Myokardgewebe und die Etablierung stark angereicherter Primärkulturen von Endothelzellen und Perizyten arteriolären und venulären Ursprungs erlauben.

Die gewonnenen Zelllinien wurden mit vier verschiedenen Verfahren (selektive Ausschabung, Anwendung von Dispase oder Protaminlösungen zur spezifischen Entfernung von Perizyten aus den Mischkulturen, Einsatz eines selektiven Kultivationsprotokolles, Säulenzuchtmethode) nachgereinigt. Im Endeffekt ergaben sich nahezu homogen zusammengesetzte Zellkulturen (Reinheitsgrade > 98%).

Zur Identifizierung und Charakterisierung der gezüchteten Zellen dienten neben der Morphologie spezielle enzym- und immunohistochemische Marker:

- von Willebrand Faktor Antigen: venuläre (schwache Konzentration) und arterioläre (hohe Konzentration) Endothelzellen
- Thrombomodulin: venuläre und arterioläre Endothelzellen
- Dipeptidylaminopeptidase IV: konfluent gewachsene, venuläre Endothelzellen.
- PECAM/AcLDL: proliferierende venuläre Endothelzellen
- Desmin/ α -Aktin: Perizyten und in schwacher Konzentration auch venuläre Endothelzellen
- Alkalische Phosphatase: Arteriolen und venöse Perizyten, starke Expression vor allem durch sessile Zellen
- Gewebefaktor: Perizyten

Schließlich ist es gelungen, ein Mikroträgerkultursystem zur Isolierung großer Mengen von Perizyten erfolgreich zu testen und einzusetzen. Daneben wurde ein neuartiges, nach Art einer Chromatographiesäule aufgebautes Zuchtsystem für

Perizyten entwickelt. In diesem ist es möglich, Perizyten stark zu vermehren und gleichzeitig nachzureinigen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass durch die vorliegende Arbeit die Grundlagen für vielversprechende und weiterführende in vitro Untersuchungen an segmentspezifischen Endothelzellen und Perizyten des kardialen Mikrogefäßsystems gelegt wurden. Entsprechende erste Anwendungen sind Gegenstand aktueller Veröffentlichungen^{18,30,38}.

Literaturverzeichnis

1. Dela Paz, N.G. & D'Amore, P.A. Arterial versus venous endothelial cells. *Cell Tissue Res* **335**, 5-16 (2009).
2. Chorianopoulos, E., Bea, F., Katus, H.A. & Frey, N. The role of endothelial cell biology in endocarditis. *Cell Tissue Res* **335**, 153-163 (2009).
3. Yuan, Y., Meng, F.Y., Huang, Q., Hawker, J. & Wu, H.M. Tyrosine phosphorylation of paxillin/pp125FAK and microvascular endothelial barrier function. *Am J Physiol* **275**, H84-93 (1998).
4. Troy, G.C. An overview of hemostasis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **18**, 5-20 (1988).
5. Stassen, J.M., Arnout, J. & Deckmyn, H. The hemostatic system. *Curr Med Chem* **11**, 2245-2260 (2004).
6. Broos, K., Feys, H.B., De Meyer, S.F., Vanhoorelbeke, K. & Deckmyn, H. Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Rev* **25**, 155-167 (2011).
7. Bouchard, B.A., Shatos, M.A. & Tracy, P.B. Human brain pericytes differentially regulate expression of procoagulant enzyme complexes comprising the extrinsic pathway of blood coagulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**, 1-9 (1997).
8. Juchem, G., *et al.* Pericytes in the macrovascular intima: possible physiological and pathogenetic impact. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **298**, H754-770 (2010).
9. Weiss, D.R., Juchem, G., Kemkes, B.M., Gansera, B. & Nees, S. Extensive deendothelialization and thrombogenicity in routinely prepared vein grafts for coronary bypass operations: facts and remedy. *Int J Clin Exp Med* **2**, 95-113 (2009).
10. Armulik, A., Abramsson, A. & Betsholtz, C. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res* **97**, 512-523 (2005).
11. Weiss, D.R. "Perizyten": Endothel-assoziierte Zellen, auch in der Intima der Aorta und Vena saphena. *Dissertation zum Erwerb des Doktorengrades der Medizin, Ludwig-Maximilians-Universität München* (2004).
12. Gerhardt, H. & Betsholtz, C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res* **314**, 15-23 (2003).
13. Kutcher, M.E. & Herman, I.M. The pericyte: cellular regulator of microvascular blood flow. *Microvasc Res* **77**, 235-246 (2009).
14. Diaz-Flores, L., *et al.* Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche. *Histol Histopathol* **24**, 909-969 (2009).
15. Simionescu, M., Popov, D. & Sima, A. Endothelial transcytosis in health and disease. *Cell Tissue Res* **335**, 27-40 (2009).
16. Dejana, E., Orsenigo, F., Molendini, C., Baluk, P. & McDonald, D.M. Organization and signaling of endothelial cell-to-cell junctions in various regions of the blood and lymphatic vascular trees. *Cell Tissue Res* **335**, 17-25 (2009).
17. Frank, P.G., Pavlides, S. & Lisanti, M.P. Caveolae and transcytosis in endothelial cells: role in atherosclerosis. *Cell Tissue Res* **335**, 41-47 (2009).
18. Nees, S., *et al.* Wall structures of myocardial precapillary arterioles and postcapillary venules reexamined and reconstructed in vitro for studies on barrier functions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **302**, H51-68 (2012).
19. Wolburg, H., Noell, S., Mack, A., Wolburg-Buchholz, K. & Fallier-Becker, P. Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. *Cell Tissue Res* **335**, 75-96 (2009).
20. Oda, M., Yokomori, H. & Han, J.Y. Regulatory mechanisms of hepatic microcirculation. *Clin Hemorheol Microcirc* **29**, 167-182 (2003).
21. Hordijk, P. Endothelial signaling in leukocyte transmigration. *Cell Biochem Biophys* **38**, 305-322 (2003).

22. Jaffe, E.A., Nachman, R.L., Becker, C.G. & Minick, C.R. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* **52**, 2745-2756 (1973).
23. Langendorff, O. Untersuchungen an überlebenden Säugetierherzen. *Pflugers Arch gesamte Physiol* **61**, 291-332 (1895).
24. Thalmair, M. Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung von Endothelzellen aus subkutanem Bauchfett des Menschen und des Pavians um Zwecke der Endothelialisierung vaskulärer Prothesen. *Dissertation zum Erwerb des Doktorengrades der Medizin, Ludwig-Maximilians-Universität München* (2000).
25. Lojda, Z. The histochemical demonstration of brush border endopeptidase. *Histochemistry* **64**, 205-221 (1979).
26. Ackermann, G. [Chronic lymphadenosis--aleukemic reticulosis. Pathomorphological observations and course]. *Z Gesamte Inn Med* **17**, 261-265 (1962).
27. Geier, M. Studien zur Integrität, Barrierefunktion und Thrombogenität der Intima koronarer Bypass-Segmente venösen Ursprung. *Dissertation zum Erwerb des Doktorengrades der Medizin, Ludwig-Maximilians-Universität München* (2012).
28. Dendorfer, A. Kompartimentierung des myokardialen Purinstoffwechsels: Studien an isolierten Kardiomyozyten und Mikrogefäßen des Meerschweinchenherzens. *Dissertation zum Erwerb des Doktorengrades der Medizin, Ludwig-Maximilians-Universität München* (1990).
29. Juchem, G. Etablierung und Charakterisierung mikrovaskulärer Endothelzellen und Perizyten aus dem bovinen Koronarsystem in Gewebekultur. *Dissertation zum Erwerb des Doktorengrades der Medizin, Ludwig-Maximilians-Universität München* (2000).
30. Nees, S., *et al.* Isolation, bulk cultivation, and characterization of coronary microvascular pericytes: the second most frequent myocardial cell type in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **302**, H69-84 (2012).
31. Mattfeldt, T. & Mall, G. Dipyridamole-induced capillary endothelial cell proliferation in the rat heart--a morphometric investigation. *Cardiovasc Res* **17**, 229-237 (1983).
32. Oxhorn, B.C., Hirzel, D.J. & Buxton, I.L. Isolation and characterization of large numbers of endothelial cells for studies of cell signaling. *Microvasc Res* **64**, 302-315 (2002).
33. Sobczak, M., Dargatz, J. & Chrzanowska-Wodnicka, M. Isolation and culture of pulmonary endothelial cells from neonatal mice. *J Vis Exp* (2010).
34. Plendl, J., Neumuller, C., Vollmar, A., Auerbach, R. & Sinowatz, F. Isolation and characterization of endothelial cells from different organs of fetal pigs. *Anat Embryol (Berl)* **194**, 445-456 (1996).
35. He, Q. & Spiro, M.J. Isolation of rat heart endothelial cells and pericytes: evaluation of their role in the formation of extracellular matrix components. *J Mol Cell Cardiol* **27**, 1173-1183 (1995).
36. Johnson, E.K., Schelling, M.E., Quitadamo, I.J., Andrew, S. & Johnson, E.C. Cultivation and characterization of coronary microvascular endothelial cells: a novel porcine model using micropigs. *Microvasc Res* **64**, 278-288 (2002).
37. Helmbold, P., Nayak, R.C., Marsch, W.C. & Herman, I.M. Isolation and in vitro characterization of human dermal microvascular pericytes. *Microvasc Res* **61**, 160-165 (2001).
38. Juchem, G., *et al.* Regulation of coronary venular barrier function by blood borne inflammatory mediators and pharmacological tools: insights from novel microvascular wall models. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **302**, H567-581 (2012).
39. Thalmair, M. Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung von Endothelzellen aus subkutanem Bauchfett des Menschen und des Pavians zum Zwecke der

- Endothelialisierung vaskulärer Prothesen. *Dissertation zum Erwerb des Doktorengrades der Medizin, Ludwig-Maximilians-Universität München* (2000).
40. Heilmeier, B. Isolierung und funktionelle Charakterisierung venulärer Endothelzellen aus Meerschweinchenherzen. *Dissertation zum Erwerb des Doktorengrades der Medizin, Ludwig-Maximilians-Universität München* (2004).
 41. Moyer, C.F., Dennis, P.A., Majno, G. & Joris, I. Venular endothelium in vitro: isolation and characterization. *In Vitro Cell Dev Biol* **24**, 359-368 (1988).
 42. Schelling, M.E., Meininger, C.J., Hawker, J.R., Jr. & Granger, H.J. Venular endothelial cells from bovine heart. *Am J Physiol* **254**, H1211-1217 (1988).
 43. Craig, L.E., Spelman, J.P., Strandberg, J.D. & Zink, M.C. Endothelial cells from diverse tissues exhibit differences in growth and morphology. *Microvasc Res* **55**, 65-76 (1998).
 44. Haribalaganesh, R., *et al.* Isolation and characterization of goat retinal microvascular endothelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **46**, 529-537 (2010).
 45. Cha, S.T., Talavera, D., Demir, E., Nath, A.K. & Sierra-Honigmann, M.R. A method of isolation and culture of microvascular endothelial cells from mouse skin. *Microvasc Res* **70**, 198-204 (2005).
 46. Nishida, M., *et al.* Isolation and characterization of human and rat cardiac microvascular endothelial cells. *Am J Physiol* **264**, H639-652 (1993).
 47. Kern, P.A., Knedler, A. & Eckel, R.H. Isolation and culture of microvascular endothelium from human adipose tissue. *J Clin Invest* **71**, 1822-1829 (1983).
 48. Gupta, K., Ramakrishnan, S., Browne, P.V., Solovey, A. & Hebbel, R.P. A novel technique for culture of human dermal microvascular endothelial cells under either serum-free or serum-supplemented conditions: isolation by panning and stimulation with vascular endothelial growth factor. *Exp Cell Res* **230**, 244-251 (1997).
 49. Jinga, V.V., *et al.* Establishment of a pure vascular endothelial cell line from human placenta. *Placenta* **21**, 325-336 (2000).
 50. Voyta, J.C., Via, D.P., Butterfield, C.E. & Zetter, B.R. Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein. *J Cell Biol* **99**, 2034-2040 (1984).
 51. Hu, J., *et al.* Protamine sulfate downregulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and inhibits VEGF and its receptor binding in vitro. *Adv Exp Med Biol* **664**, 341-347 (2010).
 52. Weber, S.C., *et al.* Isolation and culture of fibroblasts, vascular smooth muscle, and endothelial cells from the fetal rat ductus arteriosus. *Pediatr Res* **70**, 236-241 (2011).
 53. Moss, S.C., Bates, M., Parrino, P.E. & Woods, T.C. Isolation of endothelial cells and vascular smooth muscle cells from internal mammary artery tissue. *Ochsner J* **7**, 133-136 (2007).
 54. Lang, I., *et al.* Human fetal placental endothelial cells have a mature arterial and a juvenile venous phenotype with adipogenic and osteogenic differentiation potential. *Differentiation* **76**, 1031-1043 (2008).
 55. Kobayashi, M., Inoue, K., Warabi, E., Minami, T. & Kodama, T. A simple method of isolating mouse aortic endothelial cells. *J Atheroscler Thromb* **12**, 138-142 (2005).
 56. Huang, H., McIntosh, J. & Hoyt, D.G. An efficient, nonenzymatic method for isolation and culture of murine aortic endothelial cells and their response to inflammatory stimuli. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **39**, 43-50 (2003).
 57. Dame, M.K., *et al.* A stepwise method for the isolation of endothelial cells and smooth muscle cells from individual canine coronary arteries. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **39**, 402-406 (2003).
 58. Machi, T., Kassell, N.F. & Scheld, W.M. Isolation and characterization of endothelial cells from bovine cerebral arteries. *In Vitro Cell Dev Biol* **26**, 291-300 (1990).

59. Diglio, C.A., Liu, W., Grammas, P., Giacomelli, F. & Wiener, J. Isolation and characterization of cerebral resistance vessel endothelium in culture. *Tissue Cell* **25**, 833-846 (1993).
60. Diglio, C.A., Grammas, P., Giacomelli, F. & Wiener, J. Rat cerebral microvascular smooth muscle cells in culture. *J Cell Physiol* **129**, 131-141 (1986).
61. Mogensen, C., *et al.* Isolation and functional characterization of pericytes derived from hamster skeletal muscle. *Acta Physiol (Oxf)* **201**, 413-426 (2011).
62. Dore-Duffy, P. Isolation and characterization of cerebral microvascular pericytes. *Methods Mol Med* **89**, 375-382 (2003).
63. Kang, S.G., *et al.* Isolation and perivascular localization of mesenchymal stem cells from mouse brain. *Neurosurgery* **67**, 711-720 (2010).
64. Weiskirchen, R. & Gressner, A.M. Isolation and culture of hepatic stellate cells. *Methods Mol Med* **117**, 99-113 (2005).
65. Dente, C.J., Steffes, C.P., Speyer, C. & Tyburski, J.G. Pericytes augment the capillary barrier in in vitro cocultures. *J Surg Res* **97**, 85-91 (2001).
66. Song, S., Ewald, A.J., Stallcup, W., Werb, Z. & Bergers, G. PDGFRbeta+ perivascular progenitor cells in tumours regulate pericyte differentiation and vascular survival. *Nat Cell Biol* **7**, 870-879 (2005).
67. Santiago, A., *et al.* A specific Fc gamma receptor on cultured rat mesangial cells. *J Immunol* **143**, 2575-2582 (1989).
68. Nayak, R.C. & Herman, I.M. Bovine retinal microvascular pericytes : isolation, propagation, and identification. *Methods Mol Med* **46**, 247-263 (2001).
69. Sakagami, K., Kodama, T. & Puro, D.G. PDGF-induced coupling of function with metabolism in microvascular pericytes of the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**, 1939-1944 (2001).
70. Kawamura, H., Oku, H., Li, Q., Sakagami, K. & Puro, D.G. Endothelin-induced changes in the physiology of retinal pericytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**, 882-888 (2002).
71. Matsushita, K. & Puro, D.G. Topographical heterogeneity of K(IR) currents in pericyte-containing microvessels of the rat retina: effect of diabetes. *J Physiol* **573**, 483-495 (2006).
72. Capetandes, A. & Gerritsen, M.E. Simplified methods for consistent and selective culture of bovine retinal endothelial cells and pericytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **31**, 1738-1744 (1990).
73. Maier, C.L., Shepherd, B.R., Yi, T. & Pober, J.S. Explant outgrowth, propagation and characterization of human pericytes. *Microcirculation* **17**, 367-380 (2010).
74. Challier, J.C., Kacemi, A. & Olive, G. Mixed culture of pericytes and endothelial cells from fetal microvessels of the human placenta. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **41**, 233-241 (1995).
75. van Mourik, J.A., Romani de Wit, T. & Voorberg, J. Biogenesis and exocytosis of Weibel-Palade bodies. *Histochem Cell Biol* **117**, 113-122 (2002).
76. Talavera-Adame, D., *et al.* Characterization of microvascular endothelial cells isolated from the dermis of adult mouse tails. *Microvasc Res* **82**, 97-104 (2011).
77. Karasek, M.A. Microvascular endothelial cell culture. *J Invest Dermatol* **93**, 33S-38S (1989).
78. McGuire, P.G. & Orkin, R.W. Isolation of rat aortic endothelial cells by primary explant techniques and their phenotypic modulation by defined substrata. *Lab Invest* **57**, 94-105 (1987).
79. Mutin, M., Dignat-George, F. & Sampol, J. Immunologic phenotype of cultured endothelial cells: quantitative analysis of cell surface molecules. *Tissue Antigens* **50**, 449-458 (1997).

80. Li, Y.H., Shi, G.Y. & Wu, H.L. The role of thrombomodulin in atherosclerosis: from bench to bedside. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* **4**, 183-187 (2006).
81. Woodfin, A., Voisin, M.B. & Nourshargh, S. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**, 2514-2523 (2007).
82. Gong, N. & Chatterjee, S. Platelet endothelial cell adhesion molecule in cell signaling and thrombosis. *Mol Cell Biochem* **253**, 151-158 (2003).
83. Jonas, N.K. & Saleh, M. The expression of vascular endothelial platelet endothelial cell adhesion molecule-1 is not regulated by IFN-gamma treatment of C6 tumors in vivo. *Int J Oncol* **17**, 939-945 (2000).
84. Stewart, R.J., Kashour, T.S. & Marsden, P.A. Vascular endothelial platelet endothelial adhesion molecule-1 (PECAM-1) expression is decreased by TNF-alpha and IFN-gamma. Evidence for cytokine-induced destabilization of messenger ribonucleic acid transcripts in bovine endothelial cells. *J Immunol* **156**, 1221-1228 (1996).
85. Teng, B., Ansari, H.R., Oldenburg, P.J., Schnermann, J. & Mustafa, S.J. Isolation and characterization of coronary endothelial and smooth muscle cells from A1 adenosine receptor-knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290**, H1713-1720 (2006).
86. Allt, G. & Lawrenson, J.G. Pericytes: cell biology and pathology. *Cells Tissues Organs* **169**, 1-11 (2001).
87. Osterud, B. & Bjorklid, E. Sources of tissue factor. *Semin Thromb Hemost* **32**, 11-23 (2006).
88. Dore-Duffy, P. Pericytes: pluripotent cells of the blood brain barrier. *Curr Pharm Des* **14**, 1581-1593 (2008).
89. Dore-Duffy, P., Katychew, A., Wang, X. & Van Buren, E. CNS microvascular pericytes exhibit multipotential stem cell activity. *J Cereb Blood Flow Metab* **26**, 613-624 (2006).
90. Juniantito, V., *et al.* Immunophenotypical analyses of myofibroblasts in rat excisional wound healing: possible transdifferentiation of blood vessel pericytes and perifollicular dermal sheath cells into myofibroblasts. *Histol Histopathol* **27**, 515-527 (2012).
91. Thanabalasundaram, G., Schneidewind, J., Pieper, C. & Galla, H.J. The impact of pericytes on the blood-brain barrier integrity depends critically on the pericyte differentiation stage. *Int J Biochem Cell Biol* **43**, 1284-1293 (2011).
92. Nico, B., *et al.* Desmin-positive pericytes in the chick embryo chorioallantoic membrane in response to fibroblast growth factor-2. *Microvasc Res* **68**, 13-19 (2004).
93. Hellberg, C., Ostman, A. & Heldin, C.H. PDGF and vessel maturation. *Recent Results Cancer Res* **180**, 103-114 (2010).
94. Winkler, E.A., Bell, R.D. & Zlokovic, B.V. Pericyte-specific expression of PDGF beta receptor in mouse models with normal and deficient PDGF beta receptor signaling. *Mol Neurodegener* **5**, 32 (2010).
95. van Wezel, A.L. Growth of cell-strains and primary cells on micro-carriers in homogeneous culture. *Nature* **216**, 64-65 (1967).
96. Sun, L.Y., Lin, S.Z., Li, Y.S., Harn, H.J. & Chiou, T.W. Functional cells cultured on microcarriers for use in regenerative medicine research. *Cell Transplant* **20**, 49-62 (2011).
97. Melero-Martin, J.M., Dowling, M.A., Smith, M. & Al-Rubeai, M. Expansion of chondroprogenitor cells on macroporous microcarriers as an alternative to conventional monolayer systems. *Biomaterials* **27**, 2970-2979 (2006).
98. Justice, B.A., Badr, N.A. & Felder, R.A. 3D cell culture opens new dimensions in cell-based assays. *Drug Discov Today* **14**, 102-107 (2009).

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

acLDL	acetyliertes Low-Density-Lipoprotein
AP	alkalische Phosphatase
bFGF	basic fibroblast growth factor
BSA	bovines Serumalbumin
Carbogen	Gasgemisch aus Sauerstoff (95%) und Kohlendioxid (5%)
DAP	Dipeptidylaminopeptidase IV
DAPI	2-(4-Amidinophenyl)-6-Indolcarbamidin Dihydrochlorid
CD 141	Thrombomodulin
Dil-acLDL	acetyliertes Low-Density-Lipoprotein mit 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanin Perchlorat markiert
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
ES	Earle-Salt
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(3-Propansulfonsäure)
HES	Hepes-Earle-Salt
KHM	Krebs-Henseleit-Medium
mAB	monoklonale Antikörper
pAB	polyklonale Antikörper
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PDGFR β	Platelete derived growth factor receptor β
PECAM	Platelete Endothelial Cell Adhesion Molecule
vWF:Ag	von Willebrand Faktor-Antigen

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn **Prof. Dr. Dr. Stephan Nees** (Physiologisches Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München) für die spannende Themenstellung und die kontinuierliche Betreuung. Seine Begeisterung für die Physiologie und wissenschaftliche Tätigkeit war stets ansteckend und inspirierend. Bis weit in seinen wohlverdienten "Ruhestand" hinein war er bei der Abfassung der vorliegenden Dissertationsschrift stets mit guten Ideen und konstruktiver Kritik hilfreich zur Stelle.

Des weiteren möchte ich mich bei seiner gesamten Arbeitsgruppe der letzten Jahre bedanken. Ohne deren Vor- und Mitarbeit wäre die Durchführung des aufwendigen experimentellen Teiles kaum möglich gewesen. Besonders Herr **Dr. Dominik Weiss** ist hier hervorzuheben. Mit seinem außergewöhnlich fundierten praktischen und theoretischen Wissen führte er mich in die experimentell-wissenschaftliche Tätigkeit ein und war bei komplexen Versuchsreihen stets eine große Hilfe.

Auch auf Herrn **Michael Geier**, ebenfalls Doktorand bei Prof. Nees, war stets Verlass, wenn für aufwendige Versuche oder im Laboralltag kurzzeitig mehr als zwei Hände erforderlich waren.

Dank sagen möchte ich auch den Herren **M. Buchner** und **F. Singer** von der institutseigenen Feinwerkstatt, die für Spezialanfertigungen stets aufgeschlossen waren und diese mit großem Engagement schnell und handwerklich perfekt umsetzten.

Nicht zuletzt gilt mein großer Dank meinen Eltern, **Anton** und **Ursula Förch**, die mir mein Studium ermöglicht und mein wissenschaftliches Interesse stets gefördert haben.